



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
2009

**SUSANA BERNADETE    APLICAÇÃO DE FISH E RQ-PCR NO ESTUDO DA  
COELHO BRANCO        LEUCEMIA MIELÓIDE CRÓNICA**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
2009

**SUSANA BERNADETE COELHO BRANCO      APLICAÇÃO DE FISH E RQ-PCR NO ESTUDO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÓNICA**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e celular realizada sob a orientação científica da Doutora Lénia Jorge, Médica do Laboratório de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra e co-orientação da Doutora Ângela Cunha, Professora do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu marido pelo apoio incondicional.

## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. Adelaide Almeida**

Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Dr.<sup>a</sup> Lénia Jorge (orientadora)**

médica especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública nos Hospitais da Universidade de Coimbra

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ângela Cunha (co-orientadora)**

professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Dr. Rui Bartolo**

médico especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública nos Hospitais da Universidade de Coimbra

## **agradecimentos**

Agradeço à Doutora Lénia Jorge e à Doutora Ângela Cunha a orientação científica deste estudo.

Agradeço, em especial, à Ana Sofia Gonçalves, à Isabel Marques e ao Francisco Coelho pela oportunidade que me deram de adquirir novos conhecimentos através dos seus ensinamentos, pelo seu extraordinário apoio e pela sua amizade que foram fundamentais para a realização deste estudo.

Agradeço, ao Director de Serviço do Laboratório de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, Dr. Carlos Alberto de Freitas Ferrer Antunes pela oportunidade de realizar este trabalho e pela sua amizade.

Agradeço a todas as pessoas que trabalham no Laboratório de Hematologia dos HUC, nomeadamente, à Dr.<sup>a</sup> Margarida Lourenço, Dr. Carlos Tavares, Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Ferrer, Dr.<sup>a</sup> Rosário Seco, Tec<sup>a</sup> Sónia Almeida, Tec<sup>a</sup> Isabel Pedro, Tec<sup>a</sup> Maria Isilda Cordeiro, Tec<sup>a</sup> Maria Amélia Martins, Tec<sup>a</sup> Andreia Silva, Tec<sup>a</sup> Gina Neves, Tec<sup>a</sup> Joana Lima, Tec<sup>a</sup> Elisabete Camilo, Tec<sup>a</sup> Anabela Carvalho, Tec<sup>a</sup> Isabel Guiomar Rasteiro, Tec<sup>a</sup> Isabel Vaz, Tec.<sup>o</sup> Carlos Fortunato Ribeiro, Tec.<sup>o</sup> Armindo Gonçalves pelo seu extraordinário apoio e amizade. Agradeço ainda aos funcionários administrativos Sandra Costa, Maria Lurdes Pimentel, Maria Luz Arrobas e Liliana Carvalho.

Finalmente, agradeço aos meus pais por todo o amor e compreensão que têm tido para comigo ao longo da minha vida, ao meu marido pelo extraordinário apoio e carinho, e à minha família por todo o carinho e compreensão que tiveram para comigo.

## palavras-chave

LMC, FISH, RQ-PCR

## resumo

O equilíbrio entre proliferação, diferenciação e renovação das células estaminais encontra-se alterado em pacientes com leucemia mieloide crónica (LMC). Este efeito resulta da actividade contínua da tirosina cinase expressa como consequência da translocação cromossómica recíproca t(9; 22) (q34; q11 ) da qual resulta o cromossoma Filadelfia (Ph).

Os recentes avanços de técnicas citogenéticas e moleculares, tais como *Fluorescent In Situ Hybridisation* (FISH) e a *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction* (RQ-PCR) têm substituído o *Western Blotting* e o *Southern blotting* em complemento do estudo do cariótipo. Constituem também boas alternativas em termos de rapidez e eficácia na confirmação do diagnóstico e monitorização da terapêutica. A comparação das duas técnicas é essencial para determinar o valor destas na monitorização e diagnóstico da LMC. Na escolha de um teste laboratorial é ponderada também a necessidade de métodos rápidos e sensíveis para avaliar a resposta à terapêutica de pacientes com LMC.

Este estudo tem como objectivo avaliar a sensibilidade e utilidade clínica das técnicas de RQ-PCR e de FISH no diagnóstico e na monitorização da LMC.

O estudo incidiu sobre um grupo de 38 pacientes seguidos nas consultas de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, aos quais foi diagnosticada LMC e que foram alvo de análises por FISH e RQ-PCR. Através da correlação de Spearman foram avaliadas as concordâncias entre os resultados de FISH e de RQ-PCR. Obteve-se uma correlação significativa (0,79) entre resultados dos dois métodos no que diz respeito à concordância entre resultados positivos e negativos. Foram encontrados resultados concordantes entre FISH e RQ-PCR em 92,1% (35 pacientes) dos casos analisados e uma discordância em 7,9% (3 pacientes).

O estudo realizado apoia a possibilidade de diagnosticar e controlar a LMC por meio de FISH e por RQ-PCR, embora seja necessário o alargamento do estudo combinado por FISH e RQ-PCR a um maior número de amostras a fim de proporcionar uma avaliação mais eficaz do diagnóstico e acompanhamento da LMC.

**keywords**

LMC, FISH, RQ-PCR

**abstract**

The balance between proliferation, differentiation and renewal of stem cells is altered in patients with chronic myeloid leukemia (CML) due to the persistent activity of tyrosine kinase, resulting from the reciprocal chromosomal translocation t (9; 22) (q34, q11), that originates the so called Philadelphia chromosome (Ph).

Recent advances in cytogenetic and molecular techniques such as Fluorescent-In-Situ-Hybridisation (FISH) and Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (RQ-PCR) have replaced the Western and Southern Blotting techniques and complement the karyotype analysis, configuring a good alternative in terms of time and efficiency in the confirmation of the diagnosis and in the monitoring of the therapy. For the choice of a laboratory test is the need for rapid and sensitive methods to assess response to therapy of patients with CML. A comparison of two techniques is essential to determine the value of such approaches.

This study aimed the evaluation of the sensitivity and clinical utility of the technique of RQ-PCR and FISH in the diagnosis and monitoring of CML. The study focused on a group of 38 patients followed in the clinical hematology service of the University Hospitals of Coimbra, which were diagnosed with CML and have also been studied by FISH and RQ-PCR. The agreement of the FISH and RQ-PCR approaches was assessed through the correlation between the results of the two techniques. With regard to the consistency of positive and negative results, a correlation of 0.79 between the two methods was obtained. The results of FISH and RQ-PCR were in agreement in 92.1% (35 patients) of cases analyzed and a discrepant in 7.9% (3 patients).

The results of this study supports the potential interest of monitoring CML by FISH and RQ-PCR. Because these techniques have advantages and disadvantages, an enlarged study of the combined use of FISH and RQ-PCR would be valuable in order to provide a more effective tool for the diagnose and monitoring of the treatment of CML.

## ÍNDICE

1.1.	INTRODUÇÃO.....	14
1.2.	Hematopoiese .....	14
1.3.	As leucemias.....	15
1.4.	A Leucemia Mielóide Crónica (LMC) .....	16
1.4.1.	Incidência da LMC .....	18
1.4.2.	Fases da LMC .....	18
1.4.2.1.	Fase crónica .....	19
1.4.2.2.	Fase de aceleração .....	21
1.4.2.3.	Crise blástica .....	22
1.4.3.	Citogenética da LMC .....	22
1.4.4.	Aspectos moleculares da t(9;22) (q34;q11) .....	24
1.4.4.1.	Gene ABL .....	24
1.4.4.2.	Gene BCR .....	25
1.4.4.3.	Gene BCR-ABL .....	25
1.4.5.	Patogénese da LMC .....	27
1.4.6.	Diagnóstico da LMC .....	30
1.4.7.	Tratamento .....	31
1.4.8.	Resposta ao tratamento .....	32
1.5.	Objectivos .....	34
2.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
2.1.	População estudada .....	35
2.2.	Material biológico .....	35
2.3.	Métodos .....	35
2.3.1.	Estudo molecular .....	36
2.3.1.1.	Extracção de RNA .....	36
2.3.1.2.	Electroforese de RNA em gel de agarose .....	38
2.3.1.2.1.	Preparação do gel de agarose .....	38
2.3.1.2.2.	Preparação das amostras de RNA para a electroforese .....	38
2.3.1.2.3.	Electroforese em gel de agarose .....	39
2.3.1.3.	Preparação dos <i>primers</i> .....	39



2.3.1.4.	Preparação das sondas .....	40
2.3.1.5.	<i>Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> .....	41
2.3.1.5.1.	Reacção de transcrição reversa.....	41
2.3.1.5.2.	Preparação da mistura de reacção.....	42
2.3.1.5.3.	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> .....	42
2.3.1.5.4.	Tratamento dos dados de <i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> .....	43
2.3.2.	Estudo citogenético .....	43
2.3.2.1.	Preparação das amostras para <i>Fluorescen In Situ Hybridisation</i> .....	43
2.3.2.2.	Descrição das sondas .....	44
2.3.2.3.	Preparação das soluções de trabalho .....	46
2.3.2.4.	Hibridização .....	46
2.3.2.5.	Interpretação dos resultados de <i>Fluorescent-In-Situ-Hybridization</i> .....	47
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
3.1.	Perfil dos pacientes estudados .....	49
3.2.	Estudo molecular.....	51
3.3.	Estudo citogenético .....	54
3.4.	Comparação dos resultados dos estudos molecular e citogenético .....	58
3.4.1.	Resultados positivos para FISH e negativos para RQ-PCR .....	60
3.4.2.	Resultados negativos para FISH e positivos para RQ-PCR .....	61
3.4.3.	Cromossoma Ph negativo.....	62
4.	CONCLUSÃO.....	63
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática do processo de hematopoiese .....	15
Figura 2 - Esquema representativo do cromossoma Ph. O evento genético central na LMC consiste na translocação cromossómica recíproca t(9;22)(q34;q11) na célula estaminal hematopoiética. ....	17
Figura 3 - Representação esquemática das zonas de quebra do cromossoma 9 e do 22 e dos transcritos mais comuns. ....	26
Figura 4 - Representação esquemática da estrutura da proteína normal, ABL, e da proteína de fusão BCR-ABL, com destaque dos domínios mais importantes. ....	27
Figura 5 - Representação esquemática das principais moléculas e vias afectadas pela desregulação da actividade de tirosina cinase, que conduz ao aumento da proliferação celular, ao decréscimo de adesão das células leucémicas à medula óssea e à inibição da apoptose. ....	29
Figura 6 - Desenvolvimento da terapia da LMC. ....	31
Figura 7 – Representação esquemática da relação entre o número de células leucémicas contabilizado e o nível de resposta ao tratamento. ....	34
Figura 8 - Representação esquemática da sonda LSI t (9; 22) BCR / ABL Dual Color Dual Fusion. ....	45
Figura 9 - Representação esquemática da sonda LSI BCR/ABL + 9q34 Tri Color. ....	45
Figura 10 - Núcleo normal com o padrão 2R2V. ....	47
Figura 11 - Núcleo com translocação t(9;22) com o padrão 1R1V2F. ....	47
Figura 12 - Núcleo normal com o padrão 2RA2V. ....	47
Figura 13 - Núcleo com a translocação t(9;22) com padrão 1RA1V1F1FA. Sem deleção do cromossoma nove. ....	48
Figura 14 - Núcleo com a translocação t(9;22) com padrão 1RA1V1F. Com deleção do cromossoma nove. ....	48
Figura 15 - Taxa de incidência da LMC por sexo na população estudada.....	50
Figura 16 - Taxa de incidência da LMC por grupo etário na população estudada.....	50
Figura 17 - Fotografia do gel de agarose de uma electroforese realizada após a extracção de RNA. Da esquerda para a direita é visível um padrão de fragmentos de RNA de tamanho conhecido, duas amostras de RNA (A e B) e o controlo negativo (C).....	51

Figura 18 - Exemplo esquemático da sonda FISH: I – célula normal; II - célula com  
rearranjo BCR/ABL; a: sonda de fusão simples; b. sonda com sinal extra; c: sonda de  
Dupla fusão.....56

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Achados laboratoriais do sangue periférico de pacientes com LMC em fase crónica...	19
Tabela II - Achados laboratoriais de medula óssea de pacientes com LMC em fase crónica...	20
Tabela III - Critérios propostos pelo <i>Internacional Bone Marrow Transplant Registry</i> para caracterizar a fase acelerada da LMC..	21
Tabela IV - Achados laboratoriais nos pacientes com LMC em fase blástica.	22
Tabela V - Definição dos diferentes parâmetros de resposta à terapia.	33
Tabela VI – Quantidades de solução trabalho tampão RLT e amostra a pipetar...	37
Tabela VII - Sequências dos primers, utilizados para M-bcr BCR-ABL.	39
Tabela VIII - Sequências dos primers utilizados para m-bcr BCR-ABL.	40
Tabela IX - Sequências dos primers utilizados para o gene ABL (controlo interno).	40
Tabela X - Sequência de sonda para M-bcr BCR-ABL e m-bcr BCR-ABL.	40
Tabela XI - Sequência de sonda para o gene ABL (controlo interno).	41
Tabela XII – Resultados na análise por RQ-PCR de 38 pacientes seguidos nas consultas de hematologia.	52
Tabela XIII – Resultados na análise por FISH de 38 pacientes seguidos nas consultas de hematologia.	55
Tabela XIV –Número de casos positivos/negativos de FISH e RQ-PCR	59

## SIGLAS E ABREVIATURAS

A-MLV.....	<i>Abelson murine leukemia virus</i>
CBL .....	<i>Casitas B-lineage lymphoma protein</i>
CRKL .....	<i>CRK-oncogene-like protein</i>
der (9q) .....	Delecção derivada do cromossoma 9q
DRM .....	Doença residual mínima
EDTA .....	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAK .....	<i>Focal adhesion kinase</i>
FISH .....	<i>Fluorescent-In-Situ-Hybridisation</i>
GBR2 .....	GABA-B Receptor 2
HLA.....	<i>Human leukocyte antigen system</i>
HUC .....	Hospitais da Universidade de Coimbra
i(17q).....	Isocromossoma
IFN- $\alpha$ .....	Interferão- $\alpha$
IL.....	Interleucina
LLA .....	Leucemia linfocítica aguda
LLC .....	Leucemia linfocítica crónica
LMA .....	Leucemia mielóide aguda
LMC .....	Leucemia mielóide crónica
M-bcr .....	<i>Major breakpoint cluster region</i>
m-bcr .....	<i>Minor breakpoint cluster region</i>
Ph.....	Cromossoma Filadelfia
RQ-PCR .....	<i>Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RT-PCR .....	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SHC .....	<i>SRC homology 2-containing protein</i>
$\mu$ -bcr.....	<i>Micro breakpoint cluster region</i>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A hematopoiese

A hematopoiese inicia-se na célula estaminal pluripotente *stem cell*, capaz de se auto-renovar e diferenciar nas várias linhas celulares hematopoiéticas, produzindo todas as células sanguíneas maduras. A capacidade de auto-renovação da *stem cell* permite à medula óssea, principal local de produção de novas células, manter constante a sua celularidade em condições normais de saúde.

A medula óssea é formada pelas células do estroma que secretam moléculas extracelulares e factores de crescimento. A hematopoiese ocorre deste modo num microambiente adequado, no qual as células progenitoras são capazes de responder a factores de crescimento hematopoiético com o aumento de produção de uma ou outra linha celular quando há necessidade (Figura 1). O desenvolvimento destas células até ao estado de maturação total ocorre sob a influência de muitos factores de crescimento, incluindo a interleucina (IL) IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, o factor estimulador de colónias de granulócito e de monócito (Figura 1) (Falcao & Zago, 2001; Hoffbrand et al., 2006; Lichtman, 2007).

Os factores de crescimento são hormonas glicoproteicas que estimulam a proliferação, a diferenciação e a maturação das células progenitoras hematopoiéticas, evitam a apoptose e afectam por fagocitose e/ou citotoxicidade a função das células sanguíneas maduras sob as quais actuam (Hoffbrand et al., 2005).

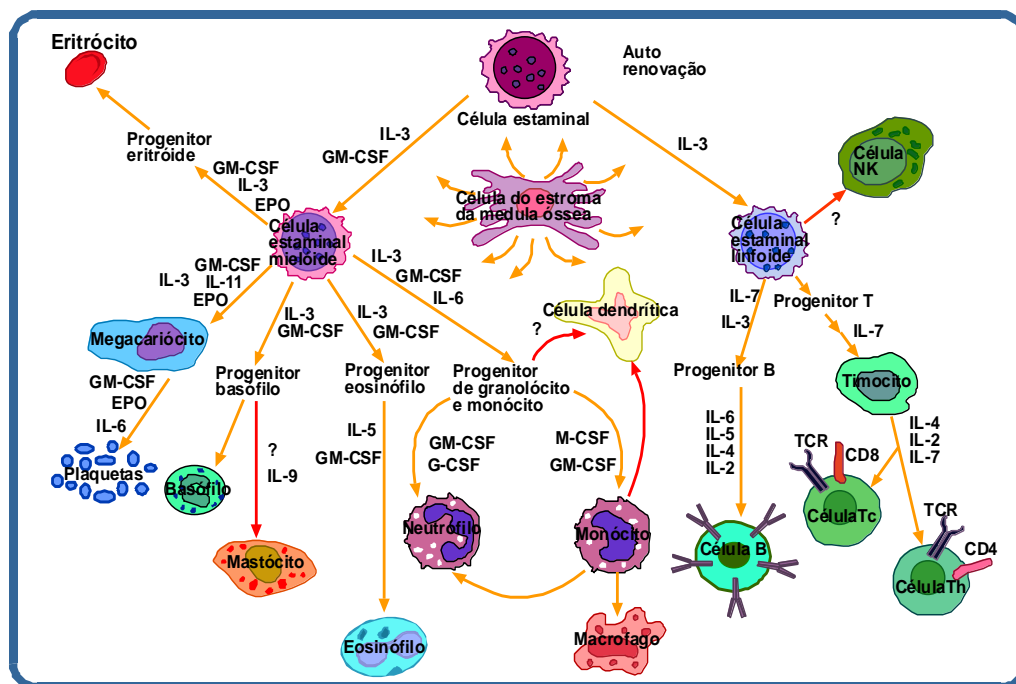


Figura 1- Representação esquemática do processo de hematopoiese (Gonçalves, 2005).

## 1.2 As leucemias

As leucemias são um grupo heterogêneo de doenças clonais que surgem da transformação maligna de células hematopoiéticas. Estas células proliferam rapidamente na medula óssea e nos órgãos linfóides primários interferindo com a produção normal de outras linhas celulares hematopoiéticas. A imaturidade dos leucócitos conduz à diminuição da imunocompetência, com aumento da susceptibilidade às infecções (Falcão & Zago, 2001).

A leucemia surge da transformação maligna de um único progenitor hematopoiético, seguida de replicação celular e expansão do clone transformado. O mecanismo de transformação neoplásico que origina a leucemia é pouco conhecido, mas sabe-se que ocorrem alterações genéticas no DNA conferindo características malignas hereditárias ao clone de células descendentes (Nalwa, 2007; Jamieson, 2008). Os rearranjos cromossômicos nos genes das células leucémicas podem alterar a regulação da proliferação celular, produzindo alterações qualitativas ou quantitativas dos produtos que codificam,

desempenhando assim um papel fundamental na iniciação e manutenção do estado leucémico (Sekeres et al., 2007; De Vita et al., 2008).

As leucemias são classificadas em crónicas ou agudas e em relação à linha celular que prolifera, tornando-se deste modo mais fácil estabelecer o prognóstico e o tratamento adequado a cada paciente. Os quatro tipos designam-se por leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielóide crónica (LMC), e leucemia linfocítica crónica (LLC).

### **1.3 A Leucemia Mielóide Crónica (LMC)**

A LMC corresponde a 15% a 20% das leucemias (Vianna et al., 2006). Define-se como uma doença mieloproliferativa clonal da célula estaminal hematopoética pluripotente, caracterizada pela proliferação clonal das células progenitoras mielóides resultando num número excessivo de células mielóides em todos os estádios de maturação (Raanani et al., 2005; Vendrame-Goloni et al., 2006; Virgili et al., 2008; Jamieson, 2008; Deininger, 2008).

A rápida expansão da célula estaminal tumoral parece ser resultado do aumento não controlado da proliferação celular, de uma diminuição da aderência das células leucémicas ao estroma da medula óssea e da redução da apoptose, o que implica vantagem de crescimento e sobrevivência das células tumorais em relação às células normais (Mark et al., 2006; Lundán et al., 2008).

O equilíbrio entre proliferação, diferenciação e renovação das células estaminais, encontra-se alterado em pacientes com LMC, devido à actividade contínua da tirosina cinase, resultante da translocação cromossómica recíproca t(9; 22) (q34; q11), que origina o denominado cromossoma Filadelfia (Ph) (Figura 2). Esta translocação é o resultado da adição de um segmento 3' do gene ABL, na sua posição normal no cromossoma 9q34, ao extremo 5' do gene BCR no cromossoma 22q11, originando o gene de fusão BCR-ABL (Kaeda et al., 2002; Hoffbrand et al., 2005; Vianna et al., 2006; Landstrom et al., 2006a; Bao et al., 2007b ; Pienkowska-Grela et al., 2007; Jesus, 2007; Polampalli et al., 2008). Esta translocação resulta na criação de dois novos genes, o BCR-ABL no cromossoma 22q-, denominado de cromossoma Ph, e o recíproco ABL-BCR no cromossoma 9 (9q+)



(Falcao & Zago, 2001; Schoch et al., 2002; Hoffrand et al., 2006; Lichtman, 2007; Hamerschlag, 2008; Joske, 2008; Richebourg et al., 2008; Malvestiti et al., 2009). O gene BCR-ABL no cromossoma Ph é expresso em praticamente todos os pacientes com LMC (Jesus, 2007; Campos et al., 2007). A descrição em 10 a 15% dos pacientes da presença de deleções que envolvem 9q+ é de grande interesse (Deininger, 2008; Kim et al., 2008).

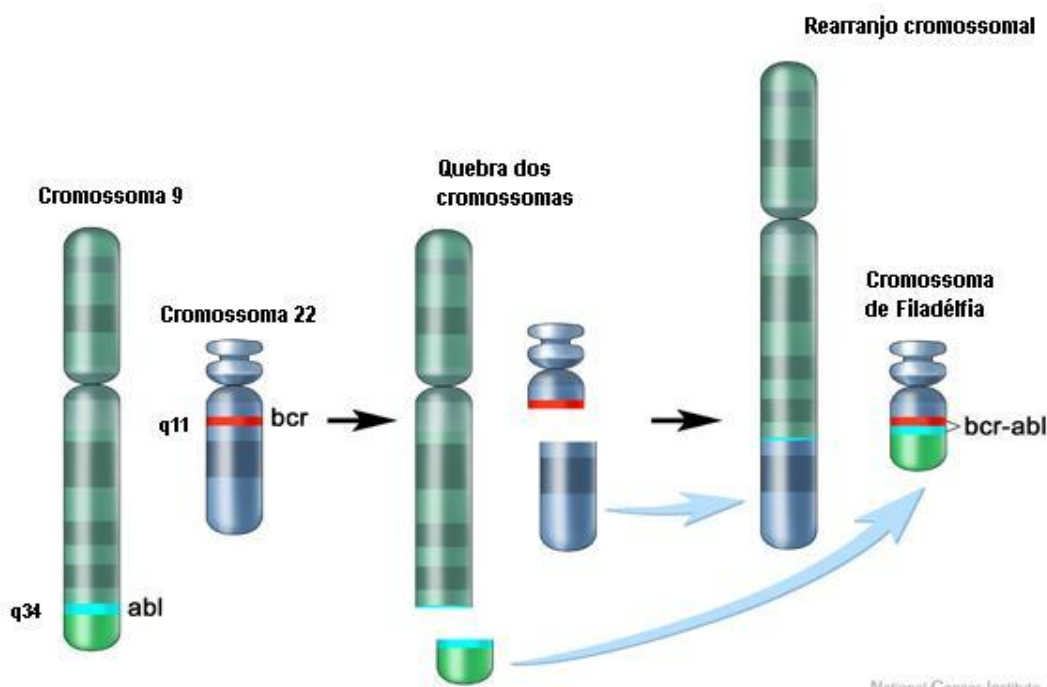


Figura 2 - Esquema representativo do cromossoma Filadélfia (Ph). O acontecimento genético central na LMC consiste na translocação cromossómica recíproca  $t(9;22)(q34;q11)$  na célula estaminal hematopoiética (adaptado de Polakova et al., 2008).

A LMC atípica (cromossoma Ph negativo) ocorre raramente e na maioria dos casos, as suas características iniciais e evolução clínica são similares às de LMC Ph positiva. Contudo, a LMC atípica inclui um grupo heterogéneo de pacientes. Em alguns destes a doença evolui mais agressivamente sendo situações de mau prognóstico (Vendrame-Goloni et al., 2006).

O cromossoma Ph pode ser detectado em pelo menos 90% dos pacientes com LMC estando também presente em 20-30% das LLA do adulto e em 2-10% das LLA da infância (Raanani et al., 2005; Bao et al., 2007a). Raros casos de LMA Ph positivo têm sido descritos, sendo associados a uma crise blástica mielóide de uma LMC Ph positivo.

O mecanismo pelo qual ocorre a translocação e o tempo necessário para a transformação na doença propriamente dita é desconhecido (Hamerschlak, 2008). Sabe-se que indivíduos expostos a altas doses de radiação apresentam risco aumentado de desenvolvimento da leucemia tal como se verificou designadamente nas catástrofes associadas ao lançamento das duas bombas atómicas no Japão (Huntly et al., 2001). Actualmente tem sido proposto também, que a proximidade dos genes BCR-ABL nas células hematopoiéticas interfásicas pode favorecer a ocorrência de translocações recíprocas (Hamerschlak, 2008; Yamamoto & Goodman, 2007).

### **1.3.1 Incidência da LMC**

A incidência da LMC parece ser constante em todo o mundo (Hoffbrand et al., 2005). A doença ocorre em ambos os sexos com a relação masculino: feminino 1,4:1 mais frequentemente entre as idades de 40 e 60 anos. No entanto pode manifestar-se em crianças, recém-nascidos, assim como em pessoas idosas (Hamerschlak, 2008; Rohrbacher et al., 2008;). A frequência deste tipo de leucemia é de 1 por 1 milhão de crianças até a idade de 10 anos. Entre os adultos, a frequência é de cerca de 1 a 2 em 100.000 indivíduos (Hamerschlak., 2008).

### **1.3.2 Fases da LMC**

A LMC é caracterizada por três fases de actividade: fase crónica, fase de aceleração e crise blástica (Mark et al., 2006). No início da doença, a LMC apresenta-se em fase indolente ou crónica, facilmente controlável com terapia. Aproximadamente 90% dos pacientes estão nessa fase no momento do diagnóstico (Kaeda et al., 2002). Com o decorrer do tempo, a doença progride para a fase de aceleração e evolução leucémica (Jamieson, 2008; Vendrame-Goloni et al., 2008).

### 1.3.2.1 Fase crónica

Na fase crónica, os pacientes com LMC mostram uma heterogeneidade clínica, ainda não esclarecida molecularmente, que envolve vários factores: factores ambientais que modulam a competição entre células estaminais normais e malignas, diferenças genéticas entre os indivíduos e diferenças entre os pontos de quebra envolvidos na translocação (Yamamoto et al., 2008; Deininger, 2008). Na fase crónica, aproximadamente 50% dos pacientes são assintomáticos, sendo o diagnóstico efectuado através da análise do hemograma (Hoffbrand et al., 2005). A característica fundamental no momento do diagnóstico é a leucocitose revelada no hemograma (Jesus, 2007). A anemia resultante de uma eritropoiese ineficaz e sobrevivência eritróide diminuída por hiperesplénismo pode ser discreta, com padrão normocrómico e normocítico (Mark et al., 2006).

Em situações raras, observa-se ainda aumento da massa eritrocitária semelhante à que ocorre em situações de policitemia vera. O esfregaço de sangue periférico permite verificar a presença de células de linhagem mielóide em todos os estádios de diferenciação, com predomínio de mielócitos e neutrófilos segmentados. É também típica a ocorrência de basofilia e eosinofilia (Tabela I).

Tabela I - Características do hemograma de sangue periférico de pacientes com LMC em fase crónica.

<b>Sangue periférico</b>
Elevado número de leucócitos ( $> 25 \times 10^9 /L$ )
Elevado número de plaquetas
Elevado número de basófilos
Reduzida actividade da fosfatase alcalina leucocitária
Todos os estadios de diferenciação granulocítica visível em esfregaço de sangue periférico

No medulograma (Tabela II) observa-se uma população densa de células mielóides com diferenciação preservada, uma relação mielóide:eritróide média de 25:1 e elevada frequência de megacariócitos (Mark et al., 2006; Jesus, 2007).

Na biopsia óssea, observa-se intensa hiper celularidade associada a células da linhagem mielóide. A linhagem megacariocítica também pode estar hiperplasiada e a rede reticulínica encontra-se geralmente aumentada (Hoffbrand et al., 2005; Deininger, 2008; Polampalli et al., 2008).

Tabela II - Características da medula óssea de pacientes com LMC em fase crónica.

<b>Medula Óssea</b>
Hiper celularidade
Gordura intramedular reduzida
Aumento do número de megacariócitos
Menos de 10% de blastos e promielócitos
Aumento da relação de células mielóides em relação às eritróides

Em mais de 90% dos casos há identificação da t(9;22) (q34; q11), através da análise molecular e do estudo citogenético. A identificação do cromossoma Ph confirma o diagnóstico (Jamieson, 2008).

Os pacientes sintomáticos exibem fadiga, anorexia, perda de peso, desconforto abdominal e sudorese. Em casos raros de leucocitose muito alta, podem surgir sintomas de hiperviscosidade, como hemorragia da retina e cefaleia (Hamerschlak, 2008). O exame físico revela esplenomegalia em 50% dos pacientes e hepatomegalia com menor frequência (Landstrom et al., 2006a). A terapia inicial com bussulfano ou hidroxiuréia pode reduzir o volume do baço a valores normais (Breccia et al., 2008).

Os pacientes com LMC em fase crónica geralmente mantêm-se sem queixas por períodos prolongados. Quando apresentam sintomas e sinais, estes são geralmente leves e relacionados com a proliferação celular aumentada. A terapia inicial é quase sempre suficiente para restabelecer rapidamente a hematopoiese. A duração desta fase é muito variável, pois a transição para outra fase pode ocorrer 3 a 8 anos após o diagnóstico. O risco de transformação é menor nos dois primeiros anos. O desenvolvimento da crise blástica ocorre em apenas 5%-10% dos pacientes (Pienkowska-Grela et al., 2007). Muitos tratamentos têm como objectivo prolongar a fase crónica, embora o transplante alogénico

de células estaminais hematopoéticas seja a melhor estratégia para a cura da doença, com a erradicação permanente do cromossoma Ph (Jamieson, 2008).

### 1.3.2.2 Fase de aceleração

A fase de aceleração da LMC caracteriza-se pela progressiva resistência à terapêutica, aumento da esplenomegalia, mielofibrose e anomalia clonal citogenética. Na medula óssea verifica-se mielodisplasia, aumento do número de blastos, ocorrência de megacariócitos anormais e hiper celularidade (Tabela III). Na fase de aceleração, os pacientes podem manter-se assintomáticos ou apresentar febre, sudorese nocturna, perda de peso e dores ósseas (Hamerschlak, 2008; Polampalli et al., 2008).

Como anomalias citogenéticas adicionais ao cromossoma Ph, podem encontrar-se entre outras, duplo cromossoma Ph e trissomia do cromossoma 8 (Mark et al., 2006). Cerca de metade (40-60%) dos pacientes permanecem de 4 a 6 meses em fase de aceleração antes de evoluir para crise blástica (Hoffbrand et al., 2005).

Tabela III - Critérios\* propostos pelo *Internacional Bone Marrow Transplant Registry* para a caracterização da fase de aceleração da LMC (Mark et al., 2006).

Anemia (hemoglobina inferior a 8 g/dL)
Leucocitose superior a $100 \times 10^9$ /L responsiva a hidroxiuréia
Trombocitopenia, com contagem de plaquetas inferior a 100.000/ ul, não relacionada à quimioterapia
Baço palpável mais que 10cm da borda costa esquerdo, não responsivo á hidroxiuréia
Blastos e promielócitos superior a 10% e inferior a 20% no sangue periférico ou medula óssea
Basófilos superior a 20% no sangue periférico
Anormalias citogenéticas adicionais

\*A presença de qualquer um dos indícios indicados é suficiente para a caracterização da fase de aceleração.

### 1.3.2.3 Crise blástica

Após um intervalo médio de 3 a 6 anos ocorre uma mudança relativamente abrupta no curso da doença. Observa-se um acúmulo progressivo de elementos celulares imaturos (mieloblastos e promielócitos) no sangue periférico e na medula óssea (Tabela IV) (Jesus, 2007).

Tabela IV - Indícios laboratoriais de fase blástica em pacientes com LMC.

Infiltrado extramedular de células leucémicas
Contagem de blastos superior a 30% no sangue periférico ou medula óssea (70% dos blastos são da linha mieloide e 20-30% são linfoblastos)
Sarcoma granulocítico

Nesta fase é comum a ocorrência de febre, suores nocturnos, anorexia, perda de peso e dores ósseas (Mark et al., 2006; Hamerschlak, 2008). A esplenomegalia aumenta, ocorre infiltração extramedular, particularmente nos nódulos linfáticos, pele, ossos e sistema nervoso central (Polampalli et al., 2008).

Somente 20%-30% dos pacientes com LMC em crise blástica respondem à quimioterapia, apresentando sobrevivência de 3 a 6 meses. A transformação para a crise blástica pode ocorrer em qualquer período, saindo directamente da fase crónica ou passando pela fase de aceleração. Raramente é conseguida remissão completa após transplante de medula óssea (Hoffbrand et al., 2005).

A crise blástica tem um prognóstico extremamente reservado e apresenta uma resposta fraca às diversas terapêuticas utilizadas (Jamieson, 2008; Vendrame-Goloni et al., 2008).

### 1.3.3 Citogenética da LMC

A LMC foi uma das primeiras doenças malignas a ser associada a uma anomalia citogenética (Bao et al., 2007a; Polakova et al., 2008). Para além da presença do

cromossoma Ph, também podem estar associadas à LMC outras anomalias (Schoch et al., 2002; Vendrame-Goloni et al., 2006; Pienkowska-Grela et al., 2007). Estas anomalias correspondem a alterações cromossómicas presentes em 10-30% dos pacientes com LMC em fase de aceleração e em cerca de 80% em crise blástica (Jones et al., 2008).

Em 2% a 10% dos casos o cromossoma Ph tem origem em translocações variantes, decorrentes tanto da simples alteração envolvendo a região 22q11, quando o segmento do cromossoma 22 é translocado para outro cromossoma que não o 9, como em alterações complexas envolvendo ambas as regiões 9q34 e 22q11 com um terceiro ou com vários outros cromossomas (Hoffbrand et al., 2005; Mark et al., 2006).

Embora todos os cromossomas, inclusive o cromossoma Y, tenham sido descritos como intervenientes nas translocações variantes, a distribuição dos pontos de quebra exhibe um padrão não-aleatório, com maior envolvimento de algumas regiões cromossómicas, designadamente 1p36, 1q21, 3p21, 5q13, 6p21, 9q22, 11q13, 12p13, 14q32, 17p13, 17q21, 17q25, 19q13, 21q22, 22q12, e 22q13 (Andrikovics et al., 2007; So et al., 2008; Rochel-Lestienne et al., 2008). Verifica-se ainda que alguns tipos específicos destas variantes são recorrentes, como as translocações t(3;9;22)(p21;q34;q11) e t(17;22)(q25;q11) (Mitelman et al., 2001; Hamerschlak, 2008). Apesar da complexidade genética destas variantes, os dados disponíveis indicam que elas não correspondem a alterações fenotípicas ou prognóstico diferente, quando comparadas com a translocação clássica t(9;22) (Johansson et al., 2002). Estas alterações podem representar um epifenómeno e determinar o comportamento biológico da neoplasia.

A caracterização das alterações cromossómicas, além de contribuir para a compreensão da base genética das leucemias, tem importância fundamental no diagnóstico e prognóstico dos pacientes uma vez que algumas mutações conferem resistência a um dos fármacos mais usado o imatinib (Andrikovics et al., 2007; Polakova et al., 2008).

O cromossoma Ph é a alteração genética predominante durante a fase crónica. Com a progressão da doença, 50% a 80% dos indivíduos adquirem alterações cromossómicas adicionais que precedem as manifestações clínicas e hematológicas da crise blástica, tais como as trissomias dos cromossomas 8, 19, 17, 21, a presença do isocromossoma i(17q), o duplo Ph, as monossomias dos cromossomas 7, 17 e a nulissomia do Y (Hoffbrand et al., 2005; Liu et al., 2008; Hamerschlak, 2008).

A detecção da deleção derivada do cromossoma 9q (der (9q)) é importante para o prognóstico uma vez que está associado a um menor tempo de sobrevivência e elevada frequência de recaída após transplante de medula óssea (5 a 10% dos casos) (Chauffaille, 2008; Malvestiti et al., 2009). Esta alteração assumiu relevância após a aplicação da técnica de *Fluorescent In Situ Hybridisation* (FISH), face a fracos resultados obtidos com outras técnicas em virtude da não detecção da deleção submicroscopia der (9q), especialmente na região 5'ABL (Kim et al., 2008). A deleção do der (9q) está associada à diminuição da resposta terapêutica com interferão- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) (Xinh et al., 2006; Pienkowska-Grela et al., 2007) resultando num mau prognóstico (Campos et al., 2007).

Deleções adjacentes aos pontos de quebra no cromossoma 9 têm sido descritas em 10% a 15% dos indivíduos com LMC. Essas deleções são da ordem de megabases, transpõem os pontos de quebra da translocação e muitas vezes resultam na perda genómica de sequências de ambos os cromossomas 9 e 22. Ocorrem simultaneamente à formação do cromossoma Ph e estão associadas a um prognóstico desfavorável (Malvestiti et al., 2009). Os pacientes que exibem a deleção têm um período curto de fase crónica e diminuição da sobrevivência (Jones et al., 2008).

### **1.3.4 Aspectos moleculares da t(9;22) (q34;q11)**

#### **1.3.4.1 Gene ABL**

O proto-oncogene *ABL* localizado em 9q34 ocupa uma região de aproximadamente 225kb e possui, no mínimo 11 exões. Este gene contém sequências homólogas às sequências v-abl do A-MuLV (*Abelson Murine Leukemia Virus*) associadas à transformação celular. A proteína ABL é expressa na maioria dos tecidos, ocorrendo tanto no núcleo como no citoplasma (Landstrom et al., 2006a).

Um mecanismo de *splicing* alternativo determina que cada um dos dois exões na região 5' (exão 1a e 1b), mas não ambos, seja traduzido com o conjunto comum dos dez exões. São transcritos dois tipos de RNAm: um tipo de 6 kb, contendo o exão 1a e um tipo



de 7 kb, contendo o exão 1b. Os transcritos codificam uma proteína tirosina-quinase nuclear não receptora, de 145 kDa (p145) (Hoffbrand et al., 2005; Polampalli et al., 2008).

A proteína ABL é regulada por auto-inibição. Este mecanismo desempenha um papel complexo na integração de sinais de fontes extracelulares (factores de crescimento, aderência celular e citocinas) e intracelulares (lesões no DNA, stresse oxidativo) e influenciam a regulação do ciclo celular, a resposta celular ao stresse e a transmissão da informação sobre o ambiente celular, por meio de sinalização de integrinas. O aumento da expressão da p145 impede a progressão do ciclo celular na fase G1/S (Lundán et al., 2008).

#### **1.3.4.2 Gene BCR**

O gene *BCR*, com actividade de cinase, localiza-se em 22q11. Apresenta aproximadamente 135 kb e contém 23 exões. Este gene codifica uma proteína de 160kDa, amplamente expressa em tecidos.

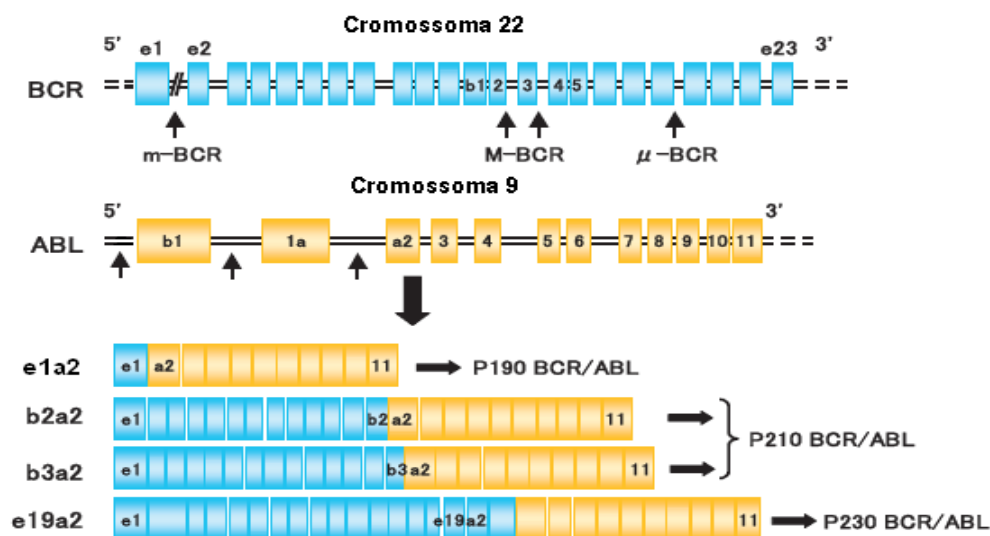
O gene *BCR* codifica uma proteína com múltiplos domínios funcionais envolvidos na oligomerização, na ligação ao domínio SH2, na actividade serina/treonina cinase e na actividade de proteínas da família das GTPases. A proteína *BCR* interage com as proteínas *G* que assumem papéis importantes na sinalização intracelular, organização do citoesqueleto, crescimento e desenvolvimento celular (Hoffbrand et al., 2005; Landstrom et al., 2006a).

#### **1.3.4.3 Gene BCR-ABL**

Na LMC, o produto da translocação t(9;22)(q34;q11) é o gene quimérico *BCR-ABL*, formado pela transposição da maior parte do gene *ABL* (exões 2-11) para o cromossoma 22, onde se liga com a região 5' do gene *BCR*. O ponto de quebra no gene *ABL* é variável, e ocorre geralmente dentro do intrão, entre os primeiros exões alternativos 1b e 1a ou entre os exões 1a e 2 (Inokuchi et al., 2006).

No gene *BCR* são descritos três pontos de quebra, conforme o apresentado na figura 3: o ponto de quebra *major breakpoint cluster region* (M-bcr) localizado entre os exões 13

e 14 ou 14 e 15, o ponto de quebra *minor breakpoint cluster region* (m-bcr) localizado no primeiro grande intrão e o *micro breakpoint cluster region* ( $\mu$ -bcr) localizado entre os exões 19 e 20 do gene BCR (Deininger et al., 2000).



Adaptado de Inokuchi, 2006

Figura 3 - Representação esquemática das zonas de quebra do cromossoma 9 e do 22 (indicadas pelas setas) e dos transcritos mais comuns (adaptado de Inokuchi, 2006).

Na maioria dos pacientes com LMC, a quebra dá-se numa área de 5,8 kb que corresponde aos exões b1 a b5 do BCR e é designada por M-bcr. Devido ao *splicing* alternativo podem formar-se transcritos do tipo b3a2 (55%), b2a2 (40%), b3a3 e b2a3 (raros) (Adler et al., 2008). O RNAm quimérico resultante dos rearranjos e13a2 (b2a2) ou e14a2 (b3a2) tem uma extensão de 8,5 kb e codifica uma proteína de 210 kDa (p210), responsável pelas anomalias fenotípicas correspondentes à fase crónica da LMC (Mark et al., 2006; Pienkowska-Grela et al., 2007; Andrikovics et al., 2007; Adler et al., 2008).

Outra possível zona de quebra está localizada numa região de 54,4kb, entre os exões e1 e e2 e designa-se como m-bcr. Os transcritos daí resultantes são o e1a2 (95%) e o e1a3 (raro) e traduzem-se numa proteína de fusão de 190 kD (p190) (Mark et al., 2006; Andrikovics et al., 2007). A p190 apresenta maior actividade tirosina cinase do que a p210 e está associada a maior severidade no quadro leucémico.

Pode ainda ser encontrada uma proteína de 230 kDa (p230) resultante do  $\mu$ -bcr correspondente ao transcrito e19a2 que está associada à trombocitose e a uma variante neutrofílica de LMC (Mark et al., 2006; Andrikovics et al., 2007).

### 1.3.5 Patogénese da LMC

O potencial oncogénico da proteína BCR-ABL deve-se à desregulação (activação permanente) da actividade de tirosina cinase (Raanani et al., 2004; Vendrame -Goloni et al, 2006; Virgili et al., 2008). Esta desregulação é promovida pela perda de estabilidade da estrutura da proteína ABL (Figura 4) (Schoch et al., 2002; Landstrom et al., 2006a; Wei, 2008). A actividade não controlada da proteína de fusão altera a função fisiológica da proteína ABL, através da interacção com uma variedade de proteínas efectoras, resultando na alteração da proliferação celular, diminuição da aderência das células leucémicas ao estroma da medula óssea e da resposta apoptótica (Pienkowska-Grela et al., 2007; Jamieson, 2008; Ding et al., 2008).

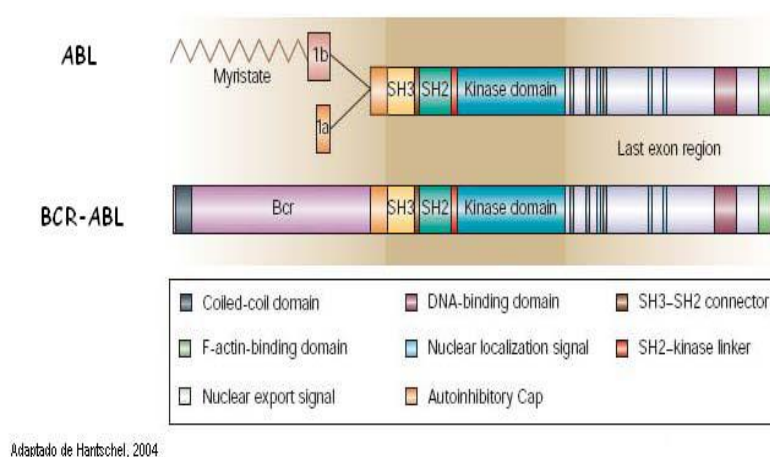


Figura 4 - Representação esquemática da estrutura da proteína normal ABL e da proteína de fusão BCR-ABL, sendo destacados os domínios mais importantes (adaptado de Hantschel, 2004)

O conhecimento da função dos vários domínios derivados das proteínas ABL e BCR permite perceber as diferentes propriedades do produto de fusão. Uma das grandes

diferenças reside na localização subcelular da proteína ABL normal e da proteína BCR-ABL. Enquanto a proteína ABL é encontrada tanto no núcleo como no citoplasma movimentando-se entre os dois compartimentos sob a influência dos domínios de localização e exportação nuclear, a proteína de fusão BCR-ABL é exclusivamente citoplasmática (Hoffbrand et al., 2005). Por outro lado, enquanto que a proteína ABL nuclear é essencialmente uma proteína pro-apoptótica, desempenhando um papel chave na resposta celular ao stresse, a proteína BCR-ABL é um forte anti-apoptótico e, embora retenha as sequências de localização e exportação nuclear, não é capaz de entrar no núcleo, por ser uma tirosina cinase activa constitutivamente (Goldman, 2003; Bao et al., 2007b).

Os efeitos celulares da proteína BCR-ABL resultam da sua interacção com várias proteínas que traduzem o sinal oncogénico responsável pela activação ou repressão da transcrição génica, a resposta mitocondrial apoptótica, a organização do citoesqueleto e a degradação de proteínas inibitórias (Mark et al., 2006).

Tem sido identificado um grande número de proteínas-alvo da proteína de fusão BCR-ABL. Estas são fosforiladas pela tirosina cinase ou induzidas/activadas pela expressão do BCR-ABL. Entre elas encontram-se proteínas adaptadoras, receptores, enzimas (cinases, fosfatases, GTPases), factores de transcrição e proteínas do citoesqueleto (Hoffbrand et al., 2005). A proteína BCR-ABL activa importantes vias de sinalização com alto potencial mitogénico (Figura 5).

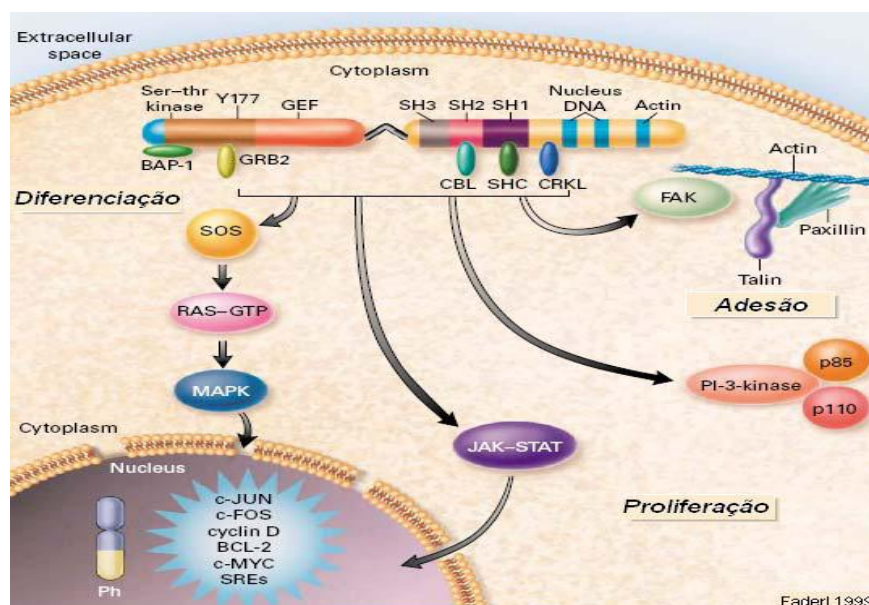


Figura 5 - Representação esquemática das principais moléculas e vias afectadas pela desregulação da actividade de tirosina cinase, que conduz ao aumento da proliferação celular, ao decréscimo de adesão das células leucémicas à medula óssea e à inibição da apoptose (Faderl et al., 1999).

As vias de sinalização até agora implicadas neste processo são as que envolvem as proteínas Ras-Raf, nomeadamente a via das Map cinases e a via JAK/STAT (Vendrame-Goloni et al., 2006). A maioria das interações são mediadas pela fosforilação de tirosinas e requerem a ligação do BCR-ABL a proteínas adaptadoras como o *GABA-B Receptor 2* (GBR2), *CRK-oncogene-like protein* (CRKL), *casitas B-lineage lymphoma protein* (CBL) e *SRC homology 2-containing protein* (SHC), que regulam a proliferação celular e a apoptose.

Para além da influência nestas vias, a BCR-ABL anula a dependência das células, de factores de crescimento externos, pela superprodução de interleucina 3, altera a adesão celular, pela modulação da expressão e activação da *focal adhesion kinase* (FAK) e proteínas associadas, induz ainda, vários efeitos na resposta de reparação do DNA, o que pode promover alterações adicionais dos cromossomas e mutações envolvidas na progressão da doença (Kantarjian et al., 2006). Deste modo, a activação desregulada da tirosina cinase é a responsável pela transformação das células estaminais hematopoiéticas e pela manutenção do fenótipo leucémico através do recrutamento e activação das vias de transdução de sinal envolvidas na transcrição génica, no processamento do mRNA

alterado, na exportação nuclear, na tradução e no aumento ou decrescimento da estabilidade proteica (Bao et al., 2007b). Todas estas alterações conduzem potencialmente à proliferação e à sobrevivência exacerbada, a apoptose alterada e à suspensão da diferenciação granulocítica (Mark et al., 2006).

As células que expressam a p210 são resistentes à apoptose. O oncogene *BCR-ABL* previne a apoptose nestas células por induzir a via de expressão do *BCL2* (Ding et al., 2008). Se a expressão deste gene for suprimida, as células revertem a dependência de factores de crescimento.

A correcção de qualquer uma das características do fenótipo alterado por um procedimento terapêutico, racionalmente idealizado, pode restabelecer a hematopoiese normal (Vendrame-Goloni et al., 2006; Jamieson, 2008).

### 1.3.6 Diagnóstico da LMC

O diagnóstico da LMC é feito por exame clínico, por observação do esfregaço de sangue periférico, contagem diferencial de leucócitos, por análise do aspirado da medula óssea com determinação da percentagem de blastos e de basófilos e por realização de hemograma (Raanani et al., 2004).

No entanto, os critérios adaptados para o diagnóstico variam. Assim, para a confirmação do diagnóstico é necessário proceder à identificação do cromossoma Ph, à identificação dos transcritos do *BCR-ABL* ou à pesquisa de ambas as evidências bem como de anomalias citogenéticas em amostras de sangue periférico ou medula óssea (Landstrom et al., 2006a; Bao et al., 2007a; Polakova et al., 2008). Para tal são usadas técnicas citogenéticas e moleculares, como a cariotipagem, *Reverse Transcription Polymerase Chain* (RT-PCR), FISH e *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain* (RQ-PCR), que permitem a detecção desta alteração genética de um modo muito específico (Raanani et al., 2004; Joske, 2008; Lundán et al., 2008). Também se usa a técnica de *Southern Blotting* que analisa o DNA genómico para determinar se o gene *BCR* é reajustado e o *Western Blotting* que analisa os lisados celulares para determinar a presença ou ausência da proteína *BCR-ABL* (Cross, 1997).

### 1.3.7 Tratamento

O objectivo do tratamento na LMC é alcançar a hematopoiese normal, não-neoplásica, durável e prolongada, com a erradicação de qualquer célula residual contendo o transcrito BCR-ABL, ou seja, a remissão molecular completa e a cura (Bao et al., 2007a; Deininger, 2008).

As decisões relativamente ao tratamento da LMC têm que atender a diversos factores, nomeadamente a idade do paciente, a resistência física às diferentes terapias e a fase da doença (Yamamoto et al., 2008).

O imatinibe foi recentemente considerado como um fármaco adequado ao controlo da LMC na maioria dos pacientes e na remissão molecular em alguns pacientes. No entanto, apesar da actual estratégia de tratamento para a fase crónica recomendar o imatinibe como terapêutica de primeira linha, são muitas vezes adoptados outros tratamentos, esquematicamente apresentados na figura 6 (Raanani et al., 2004; Mark et al., 2006; Lundán et al., 2008). Estes incluem compostos como a hidroxiureia, o IFN- $\alpha$  e o bussulfano (Cony-Makhoul et al., 2008; Richebourg et al., 2008).

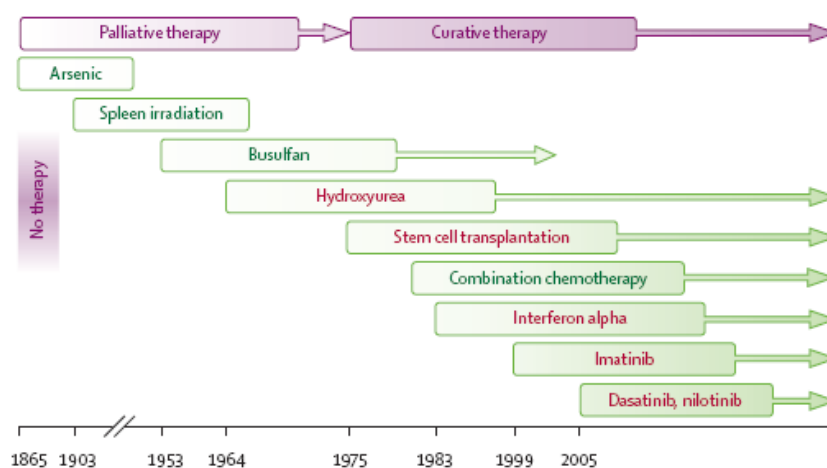


Figura 6 - Desenvolvimento da terapia da LMC. Os tratamentos destacados (vermelho) correspondem ao tipo de terapia mais comum (Helman et al., 2007).

### 1.3.8 Resposta ao tratamento

Nem todos os pacientes apresentam uma resposta a longo prazo ao imatinibe (Raanani et al., 2004). De facto, fenómenos de resistência têm sido descritos constituindo problema clínico emergente na LMC (Hamerschlak, 2008). Nestes caso, novos inibidores da multi-cinase como o nilotinibe ou dasatinibe, bem como o transplante de células estaminais, representam alternativas ao tratamento. A decisão sobre terapias de segunda linha e a selecção do fármaco é geralmente baseada na presença da translocação BCR-ABL e no tipo de mutações presentes, na fase da doença, e noutros factores relacionados com a doença, designadamente a idade (Valent et al., 2008).

O transplante de medula óssea alogénico é o único tratamento curativo para a LMC e, quando possível, o preferido (Bao et al., 2007a). Os resultados do transplante dependem de múltiplos factores nomeadamente a idade, a fase da doença, o tipo de dador (gémeo singénico monozigótico ou alogénio *human leukocyte antigen system* (HLA) compatível, relacionado ou não) (Hoffbrand et al., 2005; Yamamoto & Goodman, 2008; Rohrbacher et al., 2008; Vendrame-Goloni et al., 2008).

A resposta ao tratamento dá-se por uma determinada sequência. Primeiro verifica-se a recuperação do tamanho do baço e a normalização da contagem celular sanguínea (resposta hematológica), seguindo-se o desaparecimento das células portadoras do cromossoma Ph (resposta citogenética) e, finalmente, a redução do número de transcritos BCR-ABL até níveis muito baixos ou indetectáveis (resposta molecular) (Chauffaille, 2008).

Estes critérios podem ser usados na monitorização da resposta de cada paciente. Assim, a monitorização inclui parâmetros hematológicos, citogenéticos e moleculares, que antes de mais, deverão ser definidos (Raanani et al., 2004). Esta definição é feita de acordo com as técnicas aplicadas e os valores obtidos segundo os critérios apresentados na Tabela V (Goldman, 2007).



Tabela V - Definição dos diferentes parâmetros de resposta à terapia (Goldman, 2007).

	<b>Remissão hematológica</b>	<b>Remissão citogenética</b>	<b>Remissão molecular</b>
<b>Técnica</b>	Hemograma	Cariotipagem/FISH	PCR
<b>Parâmetro</b>	Contagem celular	Células Ph+	Transcritos BCR-ABL
<b>Definição</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Plaquetas &lt;450x10<sup>9</sup>/L</li> <li>➤ Leucócitos &lt;10x10<sup>9</sup></li> <li>➤ Ausência de células imaturas no sangue periférico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Completa: 0%</li> <li>➤ Parcial: 1-34%</li> <li>➤ Mínima: 35-90%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Completa: sem detecção de transcriptos</li> <li>➤ Maioritária: 0,1%*</li> </ul>

\* Equivalente a uma redução de 3 log de um valor base de 100% (determinado no diagnóstico)

A relação entre o número de células leucémicas, os resultados dos ensaios relativos à monitorização e as diferentes respostas definidas a partir destes resultados encontra-se representado de forma esquemática na figura 7.

Durante as últimas décadas, muitos estudos têm demonstrado que a detecção/monitorização da doença residual mínima (DRM) está significativamente correlacionada com o desempenho clínico em muitas doenças hematológicas, incluindo a LMC (Baccarani et al., 2008). Nesta, a informação sobre a DRM em momentos específicos, permite uma intervenção atempada a nível do tratamento (Bao et al., 2007a) pelo que, a detecção da DRM tem vindo a ser implementada de modo a poder orientar o tratamento ou até mesmo para avaliar o sucesso de novas terapias (Kaeda et al., 2002, Goldman, 2007).

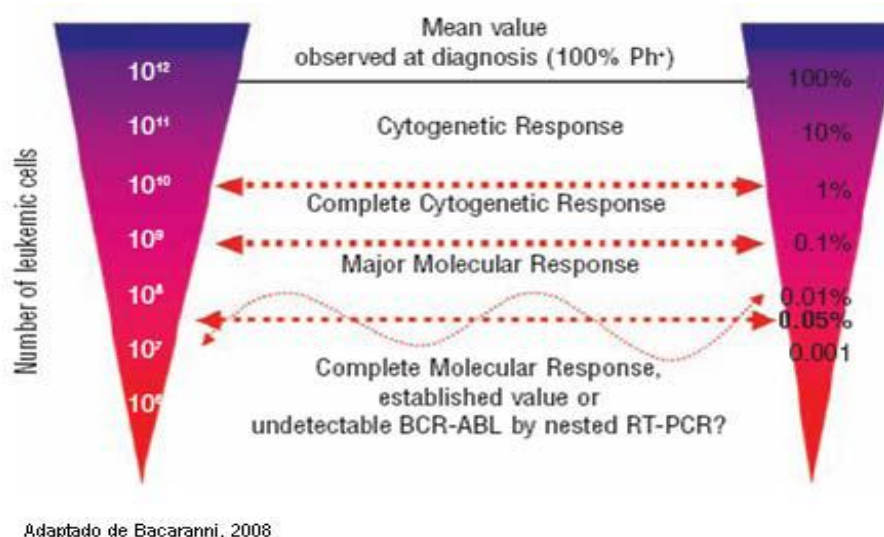


Figura 7 – Representação esquemática da relação entre o número de células leucémicas contabilizado e o nível de resposta ao tratamento (Baccarani et al., 2008).

### 1.3.9 Objectivo

O desenvolvimento e implementação de testes laboratoriais passa pela necessidade de resultados rápidos e de elevada sensibilidade para avaliar a resposta à terapêutica de pacientes com LMC (Tchirkov et al., 1998). Vários estudos têm sido dirigidos à identificação do método mais útil para a detecção do rearranjo BCR-ABL em pacientes com LMC (Colleoni et al., 2000; Kim et al., 2002). Os recentes avanços de técnicas citogenéticas e moleculares tais como FISH e RQ-PCR têm substituído o *Western Blotting* e o *Southern Blotting* e complementam o estudo do cariótipo, como uma alternativa em termos de rapidez e eficácia na confirmação do diagnóstico e monitorização da terapêutica (Tchirkov et al., 1998; Kim et al., 2002). A comparação das técnicas de FISH e RQ-PCR é essencial para determinar o valor destas no diagnóstico e monitorização da LMC. Este estudo tem como objectivo avaliar a sensibilidade e utilidade clínica da técnica de RQ-PCR e de FISH no diagnóstico e monitorização da LMC.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 População estudada**

O estudo incidiu sobre um grupo de 38 pacientes seguidos nas consultas de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), aos quais foi diagnosticada LMC e aos quais foi realizado o estudo por FISH e RQ-PCR. As amostras foram seleccionadas aleatoriamente entre os pacientes com LMC que são acompanhados nas consultas de hematologia. A componente laboratorial do estudo foi executada no laboratório de hematologia dos HUC.

### **2.2 Material Biológico**

O material biológico utilizado para a análise de FISH e RQ-PCR foi sangue periférico e medula óssea recolhidos em pacientes com LMC atendidos nas consultas de Hematologia dos HUC.

A medula óssea foi colhida através de punção e aspiração da medula óssea do osso esterno (preferencialmente) ou da crista ilíaca pósterio-superior e transferida para um tubo de 3 mL com EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético) (Vacuette).

O sangue periférico foi colhido através de punção venosa, e transferido para um tubo de 3 mL com EDTA (Vacuette).

Após a colheita, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente e processadas o mais rápido possível para minimizar a degradação das células.

### **2.3 Métodos**

Os procedimentos referentes às técnicas de RQ-PCR e ao FISH foram realizadas a partir dos protocolos descritos no laboratório de hematologia dos HUC. O desenvolvimento das técnicas foram realizadas de acordo com as especificações da Qiagen para o RQ-PCR e da Vysis para o FISH.

### 2.3.1 Estudo molecular

Para realizar o RQ-PCR procedeu-se à extracção de RNA das amostras de sangue e medula óssea para verificar a ocorrência de transcritos com a translocação BCR-ABL. De seguida foi realizada electroforese em gel de agarose para avaliar a eficiência da extracção de RNA. Posteriormente executou-se a técnica de RQ-PCR que inclui a preparação dos primers, sondas, da mistura de reacção e a reacção de RT.

#### 2.3.1.1 Extracção de RNA

As amostras de foram obtidas por extracção, a partir de sangue periférico ou medula óssea de pacientes com LMC. Com o objectivo de obter RNA puro e de elevada qualidade, usaram-se colunas de sílica através do QIAamp RNA Blood MiniKit (Qiagen).

Antes da extracção, confirmou-se a concentração de leucócitos (4000/L e 7000/L) por contagem no Coulter LH 780 (Beckman). Quando necessário procedeu-se à diluição das amostras com soro fisiológico (Braun).

Na primeira fase de extracção de RNA as amostras foram mantidas em gelo. Pipetou--se 5 volumes de tampão EL (Qiagen) para 1 volume de amostra de sangue periférico ou medula óssea, em tubos de 8 mL esterilizados (Eppendorf). Incubou-se em gelo 10-15 minutos. Durante a incubação misturou-se 2 vezes usando o vortex (Assistent, ramix 2789) 1-2 segundos. Sempre que necessário prolongou-se a incubação até 20 minutos de modo a obter uma mistura translúcida. Centrifugou-se o extracto (Jouan, MR1812) a 400rpm, durante 10 minutos, a 4°C. Removeu-se e desprezou-se o sobrenadante. Por cada volume de amostra adicionou-se ao *pellet* 2 volumes de tampão EL (Qiagen). Ressuspendeu-se por agitação em vortex (Assistent, ramix 2789). Centrifugou-se a mistura a 400rpm, durante 10 minutos, a 4°C (Jouan, MR1812). Removeu-se e desprezou-se o sobrenadante. Ao *pellet* de leucócitos adicionou-se tampão RTL (Qiagen) e 0,18 µL de beta-mercaptoetanol 78,13 M (Merck) por mL de tampão RTL (Tabela 6). A mistura foi agitada no vórtex (Assistent, ramix 2789).

Tabela VI – Quantidades de solução trabalho tampão RLT e amostra a pipetar .

Solução trabalho tampão RLT (μL)	Amostra (mL)	Número de leucócitos
350	Até 0.5	Até $2 \times 10^6$
600	0.5 a 1.5	$2 \times 10^6$ a $1 \times 10^7$

À temperatura ambiente, pipetou-se o lisado de uma só vez, para uma coluna QIAshredder (Qiagen) colocada num tubo colector de 2mL (Qiagen) e centrifugou-se à velocidade máxima de 16 000 rpm durante 2 minutos a 4°C (Jouan, MR1812). Eliminou-se a coluna QIAshredder (Qiagen). Adicionou-se 1 volume (350 μL ou 600 μL) de etanol a 70% (Merck) para homogeneizar o lisado e misturou-se por pipetagem. De seguida, pipetou-se a amostra cuidadosamente, incluindo qualquer precipitado que se tenha formado, para uma coluna QIAamp (Qiagen) colocada num colector (Qiagen) sem derramar nas paredes da coluna. Centrifugou-se a 10 000 rpm durante 15 segundos a 4°C (Jouan, MR1812) e eliminou-se o tubo colector. Transferiu-se a coluna QIAamp (Qiagen) para um novo tubo colector (Qiagen). Adicionou-se 350 μL de Buffer RW1 (Qiagen) à coluna (Qiagen) e centrifugou-se a 10000 rpm durante 15 segundos a 4°C (Jouan, MR1812). Após a centrifugação eliminou-se o tubo colector (Qiagen).

Preparou-se a solução de DNase adicionando 10 μL de solução Stock Dnase I (Qiagen) hidratado com 550 μL de água sem RNase (Qiagen) e adicionou-se 70 μL de tampão RDD (Qiagen) a cada amostra. Misturou-se cuidadosamente por inversão do tubo. Transferiu-se a coluna QIAamp (Qiagen) para um novo tubo colector. Adicionou-se 80μL de solução RNase (Qiagen) à coluna QIAamp (Qiagen) e incubou-se 15 minutos a 20-25°C. Aplicou-se 350 μL de tampão RW1 (Qiagen) à coluna QIAamp (Qiagen) e centrifugou-se a 10 000 rpm durante 15 segundos a 4°C (Jouan, MR1812). Eliminou-se o tubo colector (Qiagen). Transferiu-se a coluna QIAamp (Qiagen) para um novo tubo colector (Qiagen). Adicionou-se 500μL do tampão RPE (Qiagen) à coluna QIAamp (Qiagen) e centrifugou-se a 10 000 rpm durante 15 segundos a 4°C (Jouan, MR1812). Após a centrifugação eliminou-se o tubo colector.

Aplicou-se 500 μL de tampão RPE (Qiagen) à coluna QIAamp (Qiagen) e centrifugou-se a 16 000 rpm durante 3 minutos a 4°C (Jouan, MR1812). Colocou-se a coluna QIAamp

(Qiagen) num novo tubo colector (Qiagen), eliminando o tubo colector com o filtrado. Centrifugou-se a 16 000 rpm durante 1 minuto a 4°C (Jouan, MR1812). Transferiu-se a coluna QIAamp (Qiagen) para um microtubo de 1,5 mL (Qiagen) e pipetou-se 40 µL de água sem RNase (Qiagen) directamente sobre a membrana da coluna. Centrifugou-se durante 1 minuto a 10 000 rpm a 4°C (Jouan, MR1812) para eluir. Este passo foi repetido quando se trabalhou com volumes de amostra superiores a 0.5 mL. O material eluído (RNA) foi transferido para um microtubo de rosca de 1,5 mL (Qiagen), devidamente identificado para a realização posterior da electroforese.

As amostras foram conservadas a -70°C.

### **2.3.1.2 Electroforese de RNA em gel de agarose**

A electroforese foi o método utilizado para avaliar a eficiência da extracção de RNA foi avaliada por electroforese, uma vez que esta técnica permite separar as moléculas de RNA.

#### **2.3.1.2.1 Preparação do gel de agarose**

Num balão de vidro juntou-se 0.4 g de agarose a 0.8% (Amersham Pharmacia Biotech AB) e 50 mL tampão Tris-acetato contendo 48.4g de tris base (Gibcobl), 11.4mL ácido acético glacial (Merck), 18.6g de EDTA Na<sub>2</sub> (Merck) e 2g de Na OH (Merck). Aqueceu-se no microondas até ferver. Deixou-se arrefecer ligeiramente e aplicou-se 5 µL de brometo de etideo 10mg/mL (GelRed). Homogeneizou-se e verteu-se na tina de electroforese (Digel, DGH14) com a dimensão 14x14 com o pente colocado.

#### **2.3.1.2.2 Preparação das amostras de RNA para electroforese**

Preencheu-se uma folha de protocolo com o tipo de marcador de peso molecular (RNA Ladder) e com os números das amostras a correr colocados pela ordem de aplicação, reservando a primeira posição para o marcador. De acordo com a folha, pipetou-se para

cada um dos poços uma microplaca com 12 poços (Eppendorf) 7 µL de tampão Tris-Acetato-EDTA em todos os poços, 1 µL de marcador e 4.1 µL de água num dos poços e 2 µL de RNA de amostra nos restantes poços.

#### **2.3.1.2.3 Electroforese em gel de agarose**

Verteu-se o tampão Tris-acetato na tina depois de retirar os pentes da agarose já solidificada e colocou-se as placas de agarose nas posições correctas. Colocou-se as amostras e o marcador nos poços do gel tapou-se a tina, ligou-se a fonte de alimentação e deixou-se a correr cerca de 30 minutos a 90 volts. Ao fim deste tempo parou-se a electroforese desligando a fonte de alimentação e colocou-se o gel no transiluminador (San Gabriel) e fotografou-se (Kodak).

#### **2.3.1.3 Preparação dos *primers***

Os *primers* liofilizados cujas sequências são apresentadas nas tabelas VII, VIII e IX (Operon Biotechnologies) foram reconstituídos em água bidestilada (Braun), de modo a obter uma concentração final de 100µM. Prepararam-se alíquotas que foram armazenadas - 20°C. Na altura de se proceder à reacção de RQ-PCR preparou-se a solução de trabalho pipetando 1 µL de solução de *primer* (Operon Biotechnologies) e 33 µL de água bidestilada (Braun).

Tabela VII - Sequências dos *primers* (Operon Biotechnologies) utilizados para M-bcr BCR-ABL.

Código	Sequência 5' - 3'
Primer ENF501	TCC GCT GAC CAT CAA YAA GGA
Primer ENR561	CAC TCA GAC CCT GAG GCT CAA

Tabela VIII - Sequências dos *primers* (Operon Biotechnologies) utilizados para m-bcr BCR-ABL.

Código	Sequência 5' - 3'
Primer ENF402	CTG GCC CAA CGA TGG CGA
Primer ENR561	CAC TCA GAC CCT GAG GCT CAA

Tabela IX - Sequências dos *primers* (Operon Biotechnologies) utilizados para o gene ABL (controlo interno).

Código	Sequência 5' - 3'
Primer ENF1003	TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T
Primer ENR1063	GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA

#### 2.3.1.4 Preparação das sondas

As sondas liofilizadas cujas sequências são apresentadas nas tabelas X e XI (Operon Biotechnologies) foram reconstituídos em água bidestilada (Braun), de modo a obter uma concentração final de 100µM e armazenadas -20°C. Na altura de se proceder à reacção de RQ-PCR preparou-se a solução de trabalho da sonda ENPr1043, pipetando 1 µL de solução de sonda e 100 µL de água bidestilada (Braun). Para a preparação da sonda ENP541 pipetou-se 1 µL de solução de sonda e 50 µL de água destilada.

Tabela X - Sequência de sonda (Operon Biotechnologies) para M-bcr BCR-ABL e m-bcr BCR-ABL

Código	Sequência 5 - 3'
Sonda ENP541	CCC TTC AGC GGC CAG TAG CAT CTG A



Tabela XI - Sequência de sonda (Operon Biotechnologies) para o gene ABL (controlo interno).

Código	Sequência 5' - 3'
Sonda ENPr1043	CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC ACC ATT

### 2.3.1.5 Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction

Este processo foi realizado de forma automatizada no equipamento Smart Cycler System (Izasa). Foram utilizados tubos de polipropileno muito finos (Cepheid Smart Cycler) para permitir a alteração rápida da temperatura. Os produtos de PCR foram detectados em tempo real por fluorescência. Para a detecção do gene de fusão BCR-ABL foram usadas sondas TaqMan marcadas com fluorescência, específicas para este gene e com capacidade de se ligar a ele. Como controlo foi usado o gene ABL.

#### 2.3.1.5.1 Reacção de transcrição reversa

Retirou-se as amostras de RNA da arca frigorífica a  $-70^{\circ}\text{C}$ , colocando-as no suporte em gelo, por ordem, de acordo com a folha de protocolo. Identificaram-se os microtubos (ependorf) com os números das amostras e pipetou-se 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra para o respectivo microtubo. Colocou-se as amostras no termociclador PCRExpress HYBAID e seleccionou-se o programa A30 (10 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$ ).

Homogeneizou-se bem cada um dos reagentes e preparou-se a mistura de reacção. Por cada amostra, adicionou-se: 2  $\mu\text{L}$  de tampão Ficoll 400 (BioLabs), 0.2  $\mu\text{L}$  de 1.4-Ditiotreitol (DTT) a 154.3 Mr (Roche), 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs a 200  $\mu\text{M}$  (BioLabs), 2.7  $\mu\text{L}$  de primer hexamer a 186  $\mu\text{M}$  (Roche), 0.2  $\mu\text{L}$  de RNase inibitor 40U/ $\mu\text{L}$  (Roche), 0.5  $\mu\text{L}$  de Transcriptase Reversa a 200000 U/mL (BioLabs), 2.4  $\mu\text{L}$  de água bidestilada (Braun).

Homogeneizou-se bem a mistura de reacção. Retirou-se as amostras do termociclador e colocou-se em gelo, enquanto se distribuiu 10  $\mu\text{L}$  da mistura de reacção em cada tubo (ependorf). Seguiu-se a reacção de transcrição reversa que se realizou no termociclador PCRExpress HYBAID no programa A31 (10 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ , 45 minutos a

42°C,

3 minutos a 99°C). No final da reacção retirou-se os tubos do termociclador e adicionou-se 30 µL de água destilada (Braun) a cada amostra.

#### **2.3.1.5.2 Preparação da mistura de reacção de PCR**

Para a preparação da mistura de reacção para a reacção de amplificação da sequência ABL pipetou-se 12.5 µL de Quantitect (Qiagen), 2.5 µL de solução de *primer* ENF1003 (Operon Biotechnologies), 2.5 µL de solução de *primer* ENR1063 (Operon Biotechnologies), 2.5 µL de solução de sonda ENPr1043 (Operon Biotechnologies) e 1 µL de solução de polimerase Hotstartaq (Qiagen).

Para a preparação da mistura de reacção para a reacção de amplificação da sequência M-bcr pipetou-se 12.5 µL de Quantitect (Qiagen), 2.5 µL de solução de *primer* ENF501 (Operon Biotechnologies), 2.5 µL de solução de *primer* ENR561 (Operon Biotechnologies), 2.5 µL de sonda ENP541 (Operon Biotechnologies) e 1 µL de solução de polimerase Hotstartaq (Qiagen).

Para a preparação da mistura de reacção para a reacção de amplificação da sequência m-bcr pipetou-se 12.5 µL de Quantitect (Qiagen), 2.5 µL de solução de *primer* ENF402 (Operon Biotechnologies), 2.5 µL de solução *primer* ENR561 (Operon Biotechnologies), 2.5 µL de solução de sonda ENP541 (Operon Biotechnologies) e 1 µL de solução de polimerase Hotstartaq (Qiagen).

#### **2.3.1.5.3 Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction**

Para as amplificação das amostras dispensou-se 20 µL de mistura de reacção, em cada microtubo de PCR (Eppendorf) e adicionou-se 5 µL de amostra. Para o controlo dispensou-se 20 µL da mistura e 5 µL de água para um microtubo de PCR (Eppendorf). Centrifugou-se a 2000 rpm durante 2 segundos a 4°C os microtubos. Colocaram-se no termociclador (Smart Cycler System). Para a amplificação da sequência ABL seguiu-se o seguinte programa: 1 ciclo 120 segundos a 95°C seguido de 600 segundos a 95°C;

posteriormente foram realizados 50 ciclos 15 segundos a 95°C seguido de 60 segundos a 60°C. Para a amplificação da sequência M-abl e m-abl seguiu-se o seguinte programa: 1 ciclo 5 segundos a 50°C seguido de 720 segundos a 95°C; posteriormente foram realizados 50 ciclos 15 segundos a 95°C seguido de 60 segundos a 60°C.

#### **2.3.1.6 Tratamento dos dados de *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction***

O resultado (rácio) é obtido como o quociente entre o número de cópias do gene de fusão BCR-ABL na amostra de um indivíduo e a concentração do gene ABL, no mesmo indivíduo; ou seja, do expresso como a relação entre o número de cópias do gene de fusão e o número de cópias do gene ABL.

O resultado baseia-se no número de cópias do gene de fusão BCR-ABL, sendo este negativo quando o resultado é 0 (zero), e positivo quando o número de cópias é superior a 0 (zero).

### **2.3.2 Estudo citogenético**

#### **2.3.2.1 Preparação das amostras para *Fluorescent In Situ Hybridisation***

Aqueceu-se 7 mL de solução hipotónica contendo 0,56 g de cloreto de potássio a 0,075 M (Sigma) e 100 mL de água destilada (Braun) a 37°C em banho-maria (Selecta). Centrifugou-se (Jouan, B 3.11) as amostras de sangue periférico a 2 000 rpm durante 10 minutos a 20°C, desprezou-se o plasma e transferiu-se o *buffy-coat* com uma pipeta de pasteur para um tubo de 10 mL (Eppendorf) ao qual se adicionou 8-10 mL de PBS (tampão fosfato isó-osmótico) (solução contendo 23.4 g.L<sup>-1</sup> solução A; 21.3 g.L<sup>-1</sup> solução B (Sigma)), 1 mL de azida sódica a 1% (Merck) e 100 mL água destilada (Braun) perfazer até aos 1000 mL com soro fisiológico (Braun). De seguida centrifugou-se (Jouan, B 3.11) a 1500 rpm durante 5 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Este último passo foi repetido até obter um sobrenadante límpido límpido. No caso das amostras de medula óssea não foi realizada a centrifugação inicial a 2000 rpm durante 10 minutos.

Submeteu-se o *pellet* a um choque hipotónico com 8 mL de solução hipotónica previamente aquecida a 37°C. As amostras foram mantidas a esta temperatura em banho-maria (Selecta) durante 15 minutos. Posteriormente juntou-se lentamente 1mL de solução Carnoy (metanol:ácido acético glacial 3:1; Merck) e agitou-se no vórtex (Assistant, ramix 2789). Centrifugou-se (Jouan, B 3.11) de imediato a 1 500 rpm durante 5 minutos e retirou-se o sobrenadante com uma pipeta. Ressuspendeu-se o *pellet* em 8-10 mL de solução de Carnoy (Merck), agitou-se no vórtex, centrifugou-se a 1500 rpm durante 5 minutos a 20°C, removeu-se o sobrenadante e repetiu-se o processo até obter um sobrenadante límpido.

Ressuspendeu-se novamente o *pellet* em 1 mL de solução Carnoy (Merck) e transferiu-se para um microtubo de 3 mL (eppenforf) identificado com o número de amostra e a sonda a usar. Para avaliar a eficiência da extração, colocou-se 1 a 2 gotas da suspensão (núcleos dos leucócitos) numa lâmina e deixou-se secar à temperatura ambiente. Posteriormente observou-se ao microscópio (Zeiss) com objectiva de 40x e ocular 10x para verificar densidade de núcleos. As suspensões foram conservadas a -20°C até posterior análise.

#### **2.3.2.2 Descrição das sondas**

Para a detecção da translocação BCR-ABL foi utilizada a sonda LSI t (9; 22) BCR / ABL Dual Color Dual Fusion (Vysis) que consiste numa mistura de sondas marcadas com fluorescência verde para BCR e vermelho para ABL.

A sonda ABL mede aproximadamente 650 Kb e marca o cromossoma 9. A sonda BCR mede cerca de 1,5 Mb: liga-se na extremidade 3' no locus das cadeias leves lambda da imunoglobulina, estende-se ao longo do cromossoma 22 (Figura 8).

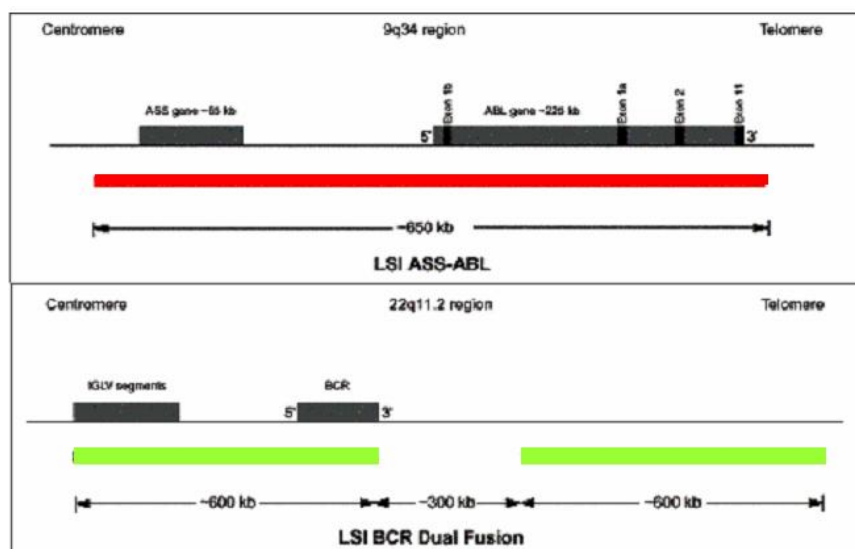


Figura 8 - Representação esquemática da sonda LSI t(9; 22) BCR / ABL Dual Color Dual Fusion (Vysis).

A sonda LSI BCR/ABL + 9q34 Tri-Color (Vysis) permite a detecção do rearranjo cromossômico BCR/ABL e perdas em 9q34. É uma mistura de duas sondas já existentes, a sonda LSI t(9;22) BCR/ABL Dual Color Dual Fusion e da sonda LSI 9q34 com fluorescência azul. É uma sonda de sequência única com cerca de 270 Kb que hibridiza com a região 9q34 correspondente que contém o gene da argininasuccinato-sintetase (Figura 9).

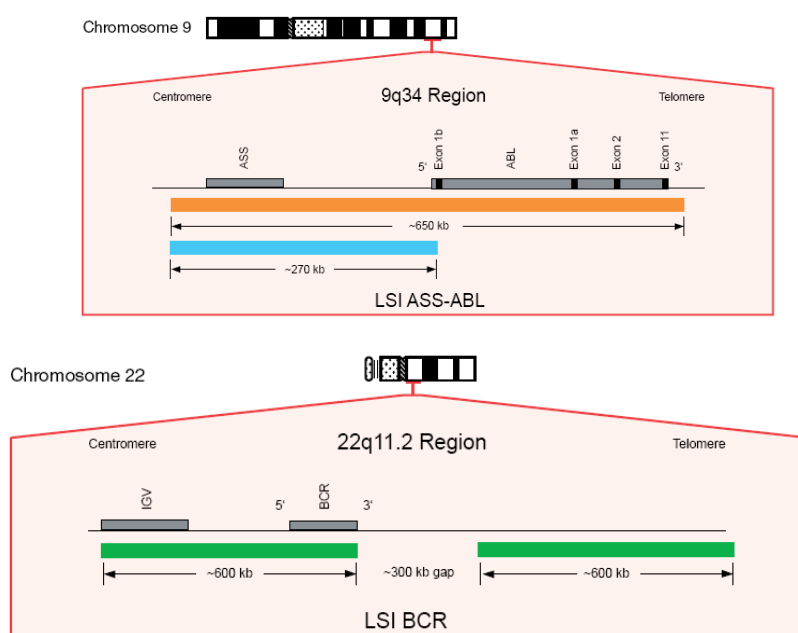


Figura 9 - Representação esquemática da sonda LSI BCR/ABL + 9q34 Tri Color (Vysis).

### **2.3.2.3 Preparação das soluções de trabalho**

Pipetou-se 3,5µL de Tampão (Vysis), 1µL de água destilada (Braun) e 0,5µL de sonda (Vysis) para um microtubo (Eppendorf) para posteriormente se aplicar esta mistura numa lamela.

### **2.3.2.4 Hibridização**

Pipetou-se 5µL da sonda preparada anteriormente para uma lamela (24 x 24mm) e colocou-se esta sobre a área de hibridização. Colocou-se a lâmina sobre uma placa de aquecimento (Selecta) a 82°C durante 4 minutos exactos. Posteriormente envolveu-se a lâmina em parafilme, de modo a evitar a evaporação e a manter a humidade, e colocou-se numa câmara húmida ao abrigo da luz a incubar a 37°C durante 12-16 horas.

Introduziu-se uma jarra de Coplin preparada com a solução de lavagem 0,4xSSC a 0,3% NP-40 (solução contendo 10 mL de solução 20xSSC (Vysis), 1,5 mL de NP-40 (Sigma) e perfez-se com água destilada (Braun) até 500 mL) num banho a 72°C. À temperatura ambiente, preparou-se uma segunda jarra de Coplin com 2xSSC a 0,1% NP-40 (solução contendo 50 mL de solução 20xSSC (132 g de 20xSSC (Vysis) e perfez-se com água destilada (Braun) até 500 mL), 0,5 mL de NP-40 (Sigma) e perfez-se com água destilada (Braun) até 500 mL).

Retirou-se a lâmina da câmara húmida e procedeu-se à sua lavagem com a solução 0,4xSSC a 0,3% NP-40 durante 2 minutos a 72°C. De seguida transferiu-se a lâmina para a solução 2xSSC a 0,1% NP-40 e procedeu-se à sua lavagem durante 2 minutos à temperatura ambiente.

Secou-se a lâmina à temperatura ambiente, no escuro, durante cerca de 15 minutos e contrastou-se com 5 µL de solução de DAPI II a 125 mg.mL<sup>-1</sup> (Abbott Molecular). Por fim observou-se ao microscópio de fluorescência (Olympus BX60 com lâmpada de mercúrio HBO 100W) equipado com filtros para o DAPI e software específico para a captação das imagens (Cytovision, versão 4.4). Foram analisados 200 núcleos em cada amostra.

### 2.3.2.5 Interpretação dos resultados de *Fluorescent In Situ Hybridisation*

Com a sonda LSI t (9; 22) BCR / ABL Dual Color Dual Fusion obtêm-se imagens do tipo das que são apresentadas nas figuras 10 e 11..

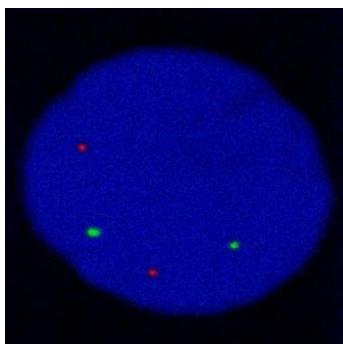


Figura 10 - Núcleo normal com o padrão 2R2V. O cromossoma 22 é marcado com fluorescência verde e o cromossoma 9 é marcado com fluorescência vermelha.

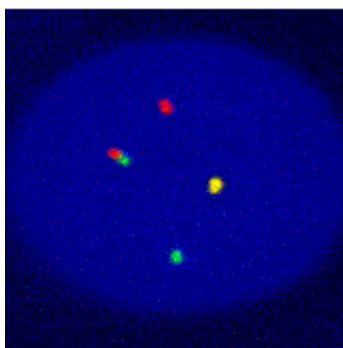


Figura 11 - Núcleo com translocação t(9;22) com o padrão 1R1V2F. O cromossoma 22 é marcado com fluorescência verde e o cromossoma 9 é marcado com fluorescência vermelha. Quando há translocação observa-se uma fluorescência amarela por sobreposição da fluorescência verde e vermelha, ou fluorescência verde e vermelha adjacentes.

Com a sonda LSI BCR/ABL + 9q34 Tri-Color obtêm-se imagens do tipo das que são apresentadas nas figuras 12, 13 e 14.

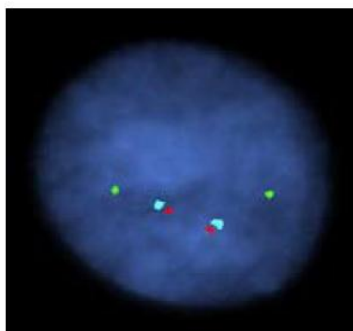


Figura 12 - Núcleo normal com o padrão 2RA2V. O cromossoma 22 é marcado com fluorescência verde e o cromossoma 9 é marcado com fluorescência vermelha/azul.

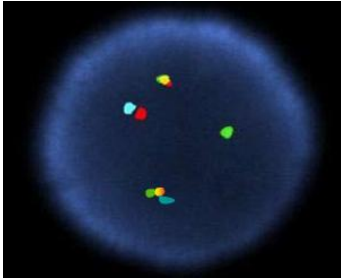


Figura 13 - Núcleo com a translocação t(9;22) com padrão 1RA1V1F1FA. O cromossoma 22 é marcado com fluorescência verde e o cromossoma 9 é marcado com fluorescência vermelha/azul. Quando há translocação observa-se uma fluorescência amarela por sobreposição da fluorescência verde e vermelha, ou fluorescência verde e vermelha adjacentes. A ocorrência de fluorescência azul adjacente à fluorescência amarela, verde e vermelha indica que não houve deleção do cromossoma 9.

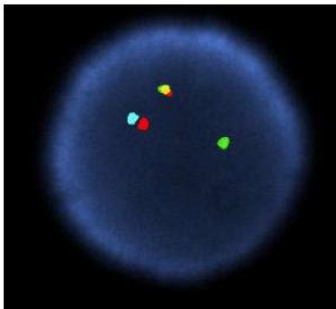


Figura 14 - Um núcleo com a translocação t(9;22) com padrão 1RA1V1F. O cromossoma 22 é marcado com fluorescência verde e o cromossoma 9 é marcado com fluorescência vermelha/azul. Quando há translocação observa-se uma fluorescência amarela por sobreposição da fluorescência verde e vermelha, ou fluorescência verde e vermelha adjacentes. A ausência de fluorescência azul adjacente à fluorescência amarela, verde e vermelha indica que houve deleção do cromossoma 9.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito enxerto-*versus*-leucemia é considerado a principal razão para que o transplante alogénico de células estaminais nas doenças hematológicas resulte no baixo valor de recaídas. O princípio da infusão de leucócitos do dador baseia-se no método em que células mononucleares do sangue periférico são colhidas do dador original e directamente infundidas no paciente na altura da recaída por leucemia (Kaeda et al., 2002; Gonçalves., 2005). Contudo, este processo pode conduzir a resultados falsos, visto existirem poucas células positivas em circulação daí a importância da sensibilidade das técnicas de FISH e RQ-PCR.

A técnica para testar a monitorização da DRM deve ser sensível, fácil de executar, e de preferência utilizando sangue periférico, visto que a colheita para obter medula óssea é mais difícil e dolorosa (Tchirkov et al., 1998; Reinhold et al., 2003; Hofbrand et al., 2005). Já foi referenciado por outros autores que as técnicas utilizadas neste estudo permitem utilizar ambas as amostras biológicas, obtendo bons resultados (Hochhaus et al., 1996; Tchirkov et al., 1998; Raanani et al., 2004). Embora se verifique uma excelente concordância entre os resultados de sangue periférico e medula óssea, a primeira escolha na DRM é usar sangue periférico como amostra (Kantarjian et al., 2003; Landstrom et al., 2006b; Lundán et al., 2008). No entanto, a fim de evitar possíveis variações nos resultados de FISH e RQ-PCR estes foram obtidos da mesma amostra de sangue periférico ou medula óssea.

#### 3.1 Perfil dos pacientes estudados

A análise dos dados epidemiológicos revela que 50% dos pacientes estudados são do sexo masculino e 50% do sexo feminino (Figura 15) o que indica a ausência de diferenças significativas entre sexos na incidência da LMC.

Esta relação difere da obtida noutros estudos presumivelmente porque a população abrangida por este estudo foi pequena. A idade na população estudada situou-se entre os 33 e os 85 anos (Figura 16). Sendo os intervalos compreendidos entre 30 e 49 anos e os 49 e 84 os que revelaram picos de incidências. Outros estudos semelhantes abrangeram uma

faixa etária mais restrita, situada entre os 40 e 60 anos (Hoffbrand et al., 2005; Yamamoto & Goodman, 2008; Hamerschlak, 2008; Rohrbacher et al., 2008).

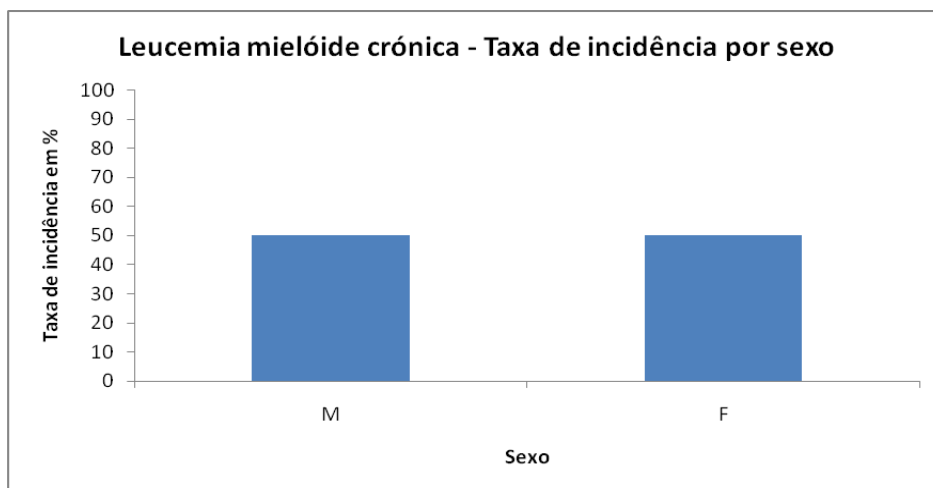


Figura 15 - Taxa de incidência da LMC por sexo na população estudada.

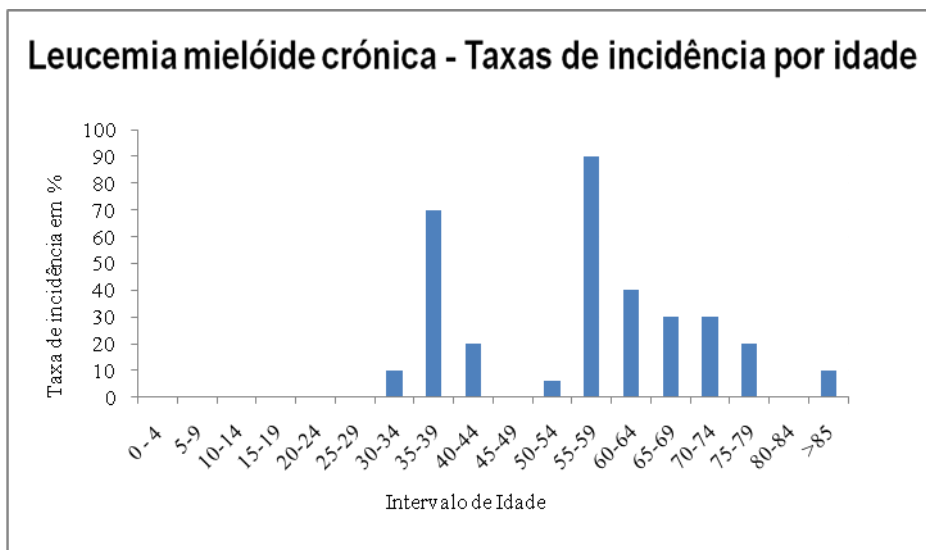


Figura 16 - Taxa de incidência da LMC por grupo etário na população estudada.

### 3.2 Estudo molecular

A electroforese em gel de agarose a 0,8 % que permitiu avaliar o rendimento e a qualidade do RNA utilizado no RQ-PCR, através intensidade e uniformidade das bandas. Foram observadas em todas as amostras duas bandas correspondentes ao RNA ribossomal de 28S e 18 S, com 4718 e 1874 nucleótidos, respectivamente (Figura 17). O controlo negativo não revelou nenhuma banda nas electroforeses realizadas após a extracção de RNA. Assim, pode-se considerar que as amostras utilizadas estavam em boas condições e que não influenciaram a fiabilidade global do estudo.

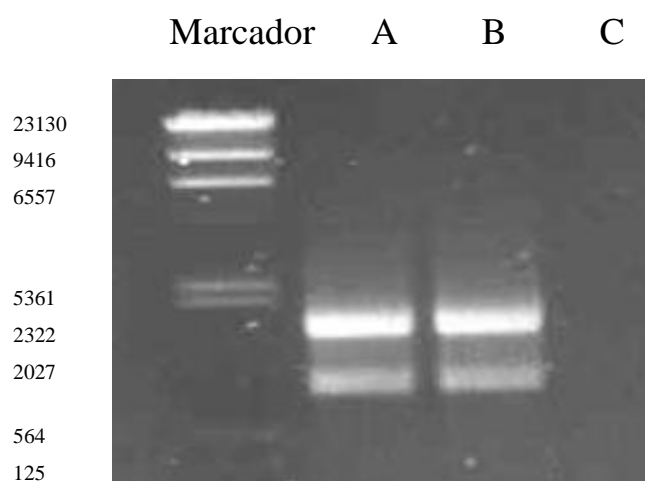


Figura 17 - Fotografia do gel de agarose de uma electroforese realizada após a extracção de RNA. Da esquerda para a direita é visível um padrão de fragmentos de RNA de tamanho conhecido, duas amostras de RNA (A e B) e o controlo negativo (C).

A sensibilidade dos ensaios concebidos para controlar a DRM por RQ-PCR dependem da qualidade e quantidade de RNA. O transporte incorrecto e a preservação deficiente do material biológico podem levar à degradação do RNA, resultando na perda de sensibilidade do método e, potencialmente, em resultados falsos negativos (Hochhaus et al., 1996; Tchirkov et al., 1998). Além disso, a degradação pode levar a estimativas imprecisas da DRM positiva (Müller et al., 2002). Para diminuir este erro as amostras foram processadas o mais rapidamente possível.

Nos 38 casos estudados verificou-se 15 resultados negativos e 23 positivos para o RQ-PCR (Tabela XII).

Tabela XII – Resultados na análise por RQ-PCR de 38 pacientes seguidos nas consultas de hematologia. \* RQ-PCR positivo para a forma *major* (p210). SP – Sangue Periférico, MO – Medula Óssea.

Paciente	Produto	Racio RQ-PCR
1	SP	0
2	SP	2,53931*
3	SP	1,17542*
4	SP	0,00172*
6	SP	0,06756*
5	SP	0,04330*
7	SP	0,00317*
8	SP	0,00183*
9	SP	0
10	SP	1,28*
11	SP	0,60*
12	SP	0
13	SP	0
14	SP	1,41347*
15	SP	1,08*
16	SP	0
17	SP	0,08530*
18	SP	0,62*
19	SP	0
20	SP	0
21	SP	2,26829*
22	SP	0
23	SP	1,04*
24	SP	0
25	SP	0
26	SP	0,02130*
27	SP	0
28	SP	0,92*
29	SP	1,84*
30	SP	0
31	SP	0
32	MO	1,70696*
33	SP	0
34	SP	0,02679*
35	SP	0
36	SP	1,53048*
37	SP	0,43076*
38	SP	0,01196*

O RQ-PCR apresentou, neste caso, a vantagem de distinguir LMC *major* de *minor*, já a sonda utilizada para FISH não permitiu este detalhe da informação. No entanto, existem sondas, como a Dual Color, que também dão esta informação e com as quais é possível detectar sub-populações de células que o RQ-PCR não amplifica (Thijssen et al., 1997; Jha et al., 2006). Neste estudo verificou-se que todos os casos positivos para RQ-PCR correspondiam a LMC *major*.

A técnica de RQ-PCR permite analisar um elevado número de amostras em simultâneo de forma semi-automatizada (Mensink et al., 1998; Raanani et al., 2004; Qin, et al., 2006; Bao et al., 2007a). Esta técnica não exige a divisão das células para que possa ser aplicada. A sua sensibilidade é de 1:1000. Podendo detectar até mesmo um cromossoma Ph positivo entre 100 ou 1000 células normais em 1 ug de RNA (Gisele et al., 2000). Este nível de sensibilidade é claramente útil para a confirmação da doença ou para a detecção de pré recaída e permite a avaliação quantitativa da DRM (Tchirkov et al., 1998; Hochhaus, 2002; Kaeda et al., 2002; Raanani et al., 2004).

Neste estudo, utilizou-se com sucesso a sequência ABL como controle da técnica RQ-PCR. Durante os últimos anos têm sido desenvolvidas análises mais sensíveis para determinar a DRM. No entanto, a escolha do controlo para o RQ-PCR varia entre os laboratórios o que dificulta a comparação dos resultados obtidos em diferentes laboratórios (Lundán et al., 2008). Bao et al. propõe a explicação de que o rácio do gene BCR-ABL e do controlo não são absolutos, e podem variar em função do fabricante e dos genes usados para comparação ou validação dos níveis de transcritos de BCR-ABL. Embora este estudo tenha utilizado o controlo ABL, outros estudos utilizaram glicose 6 fosfato desidrogenase, beta-2-microglobulina, ou beta-glucuronidase. No entanto, até agora, nenhum consenso universal foi atingido (Rulcavá et al., 2007) o que constitui ainda um problema na comparação de resultados.

O desenvolvimento de protocolos padronizados para o RQ-PCR é importante uma vez que constitui uma informação de base para a determinação da DRM (Gabert et al., 2003). Como referência são permitidas três controlos diferentes, seria importante analisar a expressão a nível médio de referência de cada controlo numa população grande e usar esse conhecimento ao converter os resultados. Um estudo europeu sobre o cancro (EAC) confirmou que os três controlos (ABL, beta-2-microglobulina, e beta-glucuronidase) tinham uma expressão estável nos diferentes tipos de amostras. No entanto, só no gene

ABL não se encontravam diferenças significativamente entre as amostras normais e as leucémicas, no momento do diagnóstico. O gene ABL é pois o controle do RQ-PCR frequente entre os diferentes controlos de referência no procedimento de detecção DRM em pacientes leucémicos de BCR-ABL obtidos com diferentes controlos de referência (Beillard et al., 2003; Lundán et al., 2008).

No sentido de obviar distorções associadas a diferentes protocolos, têm também sido propostas padronizações de outros aspectos da análise de RQ-PCR, designadamente quanto ao tipo de amostra e frequência da análise (Hughes, 2006), que podem ser relevantes no acompanhamento da evolução da doença. Propõe-se que a análise seja efectuada em sangue periférico de 3 a 6 meses durante os 2 primeiros anos após o transplante de medula e de 6 a 12 meses daí em diante (Kaeda et al., 2002).

A técnica de RQ-PCR é susceptível à contaminação cruzada que pode diminuir a sua especificidade em comparação com a técnica de FISH. Isto limita por vezes a sua utilidade como um teste de diagnóstico e acompanhamento da DRM (Raanani et al., 2004).

### **3.3 Estudo citogenético**

A qualidade das amostras sujeitas a análise pela técnica de FISH foi verificada através da observação e quantificação de núcleos. Verificou-se uma concentração adequada em todas as amostras incluídas neste trabalho assegurando que os resultados do estudo não foram negativamente afectadas pela insuficiente qualidade do material biológico. De forma a minimizar resultados falsos associados ao estado do material (Jiang et al., 2002; Jain, 2004), somente as células intactas foram contadas.

Embora existam no mercado padrões de referência para a FISH, neste estudo não foi incluído o controle de qualidade da técnica.

Nos 38 casos estudados verificou-se 16 resultados negativos e 22 positivos para o FISH (Tabela XIII).

Tabela XIII – Resultados na análise por FISH de 38 pacientes seguidos nas consultas de hematologia. \*\*  
Núcleos atípicos com del 9q34. SP – Sangue Periférico, MO – Medula Óssea.

Pacientes	Produto	<i>FISH</i> (%)
1	SP	0.0
2	SP	12.0
3	SP	29.0
4	SP	0.0
6	SP	22.0
5	SP	16
7	SP	1.0
8	SP	0.5
9	SP	0.0
10	SP	17.0
11	SP	28.0
12	SP	0.0
13	SP	0.0
14	SP	60.0
15	SP	30.0
16	SP	0.0
17	SP	3.0
18	SP	45
19	SP	0.0
20	SP	0.0
21	SP	39.0
22	SP	0.5
23	SP	35
24	SP	0.0
25	SP	0.0
26	SP	3.0
27	SP	0.0
28	SP	0.55
29	SP	0.30
30	SP	0.0
31	SP	0.0
32	MO	5.0
33	SP	0.0
34	SP	0.0
35	SP	0.0
36	SP	55
37	SP	0.25 **
38	SP	1.0**

No paciente 37 e no paciente 38 foi utilizada a sonda LSI t(9;22)BCR/ABL+9q34 TriColor e verificou-se que têm a translocação BCR-ABL e núcleos atípicos com der 9q, nos outros casos como se utilizou a sonda LSI t (9; 22) BCR / ABL Dual Color Dual Fusion apenas se sabe se os pacientes têm ou não a translocação BCR-ABL.

O desenvolvimento da técnica de FISH marcou a transição da era da citogenética clássica para a era moderna da citogenética molecular (Jiang et al., 2006). A análise de FISH requer algum pré-conhecimento sobre a anomalia, para que se possam seleccionar as sondas apropriadas, que hoje estão disponíveis para um número infinito de genes e sequências de DNA. Devido ao desenvolvimento da citogenética e dos sistemas de imagem, esta técnica tornou-se essencialmente numa ferramenta de investigação e algumas sondas têm sido usadas com sucesso na clínica (Hofbrand et al., 2005).

No início da aplicação das sondas Dual Color (fusão simples) eram por vezes registados falsos positivos, devido à justaposição geográfica de sinais, sugerindo falsa fusão. Foram implementadas duas alterações para aumentar a sensibilidade da técnica e diminuir significativamente a ocorrência de falsos positivos. Uma, foi a introdução de um sinal extra a outra conhecida como a sonda Dual Color Dual Fusion (dupla fusão) usa duas sondas que abrange os pontos de quebra dos dois genes, dando um sinal de fusão nas células positivas (Figura 18) (Hofbrand et al., 2005; Chauffaille, 2008).

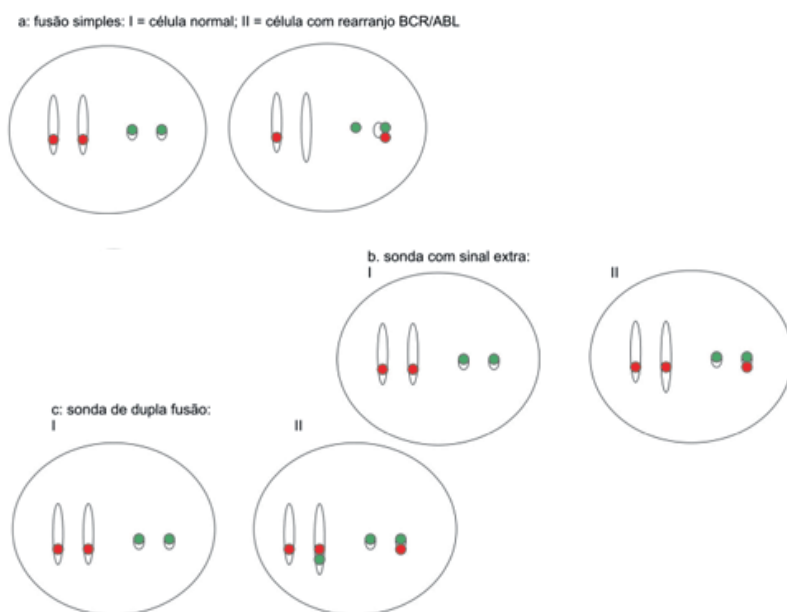


Figura 18 - Exemplo esquemático da sonda FISH: I – célula normal; II - célula com rearranjo BCR/ABL; a: sonda de fusão simples; b. sonda com sinal extra; c: sonda de dupla fusão (Chauffaille, 2008).



A análise citogenética permite detectar a ocorrência da translocação BCR-ABL e outras deleções em simultâneo. A sonda LSI t(9;22)BCR/ABL+9q34 TriColor (Vysis) permite verificar se existe a translocação BCR-ABL e a deleção no cromossoma 9. Assim, a utilização desta sonda é considerada uma abordagem eficiente e suficientemente rigorosa para acompanhar o tratamento da LMC atípica (Douet-Guilbert et al., 2004). Deve ser considerado, no entanto, que muitos resultados descritos na literatura foram obtidos com sondas de marcação simples que resultam no aumento da probabilidade de falso positivos para a fusão BCR-ABL, ao contrário das sondas de marcação dupla, como a que foi utilizada neste estudo. Com estas últimas, a possibilidade chega a ser nula (Vendrame-Goloni et al., 2006). Actualmente, a aplicação da sonda com dupla fusão tem sido considerada como adequada na detecção e quantificando com precisão do cromossoma Ph e das translocações variantes da LMC no diagnóstico e em todos os momentos após o início do tratamento, incluindo a remissão citogenética pelo cariótipo (Dewald et al., 1998). A especificidade é de 100 %, uma vez que apenas são detectadas as anomalias cromossómicas para as quais as sondas de DNA fluorescentes são específicas, e têm uma sensibilidade de 0,1% (Lundán et al., 2008).

Uma importante vantagem de técnica de FISH é que revela a heterogeneidade entre células e permite a detecção de sub-populações *minor* de células geneticamente distintas (Swiger et al., 1996; Jiang et al., 2002; Levsky et al., 2003; Jiang et al., 2006). Mais importante ainda, a técnica, não requer um processo especial de cultura de células, sendo o procedimento executado directamente no material celular. Outra vantagem da técnica de FISH é a sua capacidade de revelar anomalias citogenéticas adicionais para além do cromossoma Ph que possam surgir durante a progressão da doença. Não existe, no entanto, uma sonda que nos permita estudar todas as anomalias, sendo necessária uma sonda específica para cada anomalia (Schoch et al., 2002; Raanani et al., 2004; Vendrame-Goloni et al., 2006). O facto de esta técnica utilizar a fluorescência para a marcação tem também vantagens como a estabilidade e a segurança. É um método prático e fácil de usar (Jiang et al., 2002; Jain, 2004; Hofbrand et al., 2005; Jiang et al., 2006; Volpi et al., 2008), visto que em poucas horas se obtém resultados em células interfásicas, sem ser necessário recorrer à cultura de células para obtenção de cromossomas metafásicos (Kaeda et al., 2002; Jain, 2004; Levsky et al., 2003; Volpi et al., 2008). Para além destas, a técnica de FISH também

tem a vantagem de ser utilizado em tecidos congelados. (Swiger et al., 1996; Hofbrand et al., 2005; Landstrom et al., 2006b; Volpi et al., 2008).

Apesar de apresentar vantagens importantes, a técnica de FISH apresenta também algumas limitações. A técnica de FISH tem a contrapartida da validação dos resultados ser realizada por um observador no rastreio de vários núcleos em interfase. Um outro problema no FISH é a interpretação dos sinais, que pode variar de operador para operador, assim como o facto de o treino do operador na visualização dos sinais poder influenciar muito os resultados (Bao et al., 2007a).

O seu elevado custo constitui a principal desvantagem desta técnica (Levsky et al., 2003). Outra desvantagem frequentemente referida é a taxa falsos-positivos, ou seja, a frequência com que há co-localização do cromossoma 9 e 22 em células normais. Na prática, a frequência de núcleos com artefactos de co-localização é de 1-2 % e depende, em parte, da sonda que é utilizada, da localização precisa do ponto de quebra dentro do gene ABL e dos critérios utilizados para definir a co-localização. No presente estudo, foi usada a sonda Dual Color Dual Fusion onde este tipo de artefactos não ocorre (Tchirkov et al., 1998; Kaeda et al., 2002; Raanani et al., 2004).

### **3.4 Comparação dos resultados do estudo molecular e citogenético**

Este estudo revelou uma elevada concordância entre os obtidos pelas abordagens molecular e citogenética. Verificou-se concordância entre os resultados de FISH e RQ-PCR em 35 casos (92,1%), com resultados negativos ou positivos em ambos os testes. Verificou-se uma discordância em 3 casos (7,9%): num deles, o resultado foi positivo para FISH e negativo para RQ-PCR e em dois o resultado de FISH foi negativo enquanto o de RQ-PCR foi positivo (Tabela XIV). A concordância registada neste trabalho é superior à de estudo semelhante (Bao et al., 2007a) em que se verificou uma concordância de 84,4% entre os resultados de FISH e RQ-PCR (resultado negativo ou positivo em ambos). As discrepâncias podem estar relacionadas com as limitações específicas de cada uma das técnicas e reforçam o interesse do seu uso combinado.

Tabela XIV –Número de casos positivos/negativos de FISH e RQ-PCR

	RQ-PCR positivo	RQ-PCR negativo
FISH positivo	21	1
FISH negativo	2	14

A correlação entre os resultados obtidos pelas duas técnicas foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Spearman entre os valores do rácio RQ-PCR apresentados na tabela XII e os valores de FISH apresentados na tabela XIII, com recurso ao programa SPSS v15.0 para Windows. Obteve-se uma correlação de 0,79 entre os valores logaritmizados, o que permite dizer que não se verificam diferenças significativas entre os dois métodos utilizados na análise das respectivas amostras.

Este estudo não teve em consideração o tipo de tratamento administrado, a fase da doença ou os sintomas apresentados, sabendo-se apenas que são pacientes com LMC. Resultados semelhantes de correlação foram obtidos noutros estudos de aplicação combinada dos dois métodos de estudo (Clark et al., 2001; Press et al., 2001; Kim et al., 2002; Raanani et al., 2004). Um estudo envolvendo 23 pacientes com LMC resultou num coeficiente de correlação de 0,77, inferior ao encontrado no presente estudo (Bao et al., 2007a). No entanto, em recém-diagnosticados, casos não tratados ou de recaída a concordância foi de 100% entre o FISH e o RQ-PCR. Numa outra população maior (350 pacientes com LMC) obteve-se uma correlação de 0,91 entre os resultados de FISH e RQ-PCR (Schoch et al., 2002). Estudos realizados em pacientes tratados com imatibibe demonstram que se mantêm a elevada concordância entre os resultados de FISH e o RQ-PCR (Merx et al., 2002; Raanani et al., 2002; Raanani et al., 2004; Cortes et al., 2005). O presente estudo vem reforçar as evidências da boa correlação entre as técnicas FISH e RQ-PCR aplicadas ao estudo de pacientes com LMC.

A evolução clonal está associada à diminuição da resposta ao tratamento e à menor sobrevivência na fase crónica e na fase de aceleração da LMC (Duba et al., 1999; Marktel et al., 2003; Haigh & Cuthbert, 2004; Wu et al., 2007). Os pacientes identificados com os números 37 e 38, revelaram resultados positivos com ambos os métodos. Segundo diversos estudos, a evolução clonal não exclui a resposta molecular e citogenética (Cox et al., 1998;

Kantarjian et al., 2003; Raanani et al., 2004; Cianciulli et al., 2004; Pienkowska-Grela et al., 2007). Assim, não deveriam existir diferenças entre os resultados de FISH e RQ-PCR. No entanto, no estudo realizado os resultados foram discordantes em 3 casos. Discrepâncias observadas entre o FISH e o RQ-PCR podem estar relacionadas com diferenças biológicas ou de problemas na amplificação dos diferentes genes alvo, mas podem também resultar da manipulação e preparação das amostras com ganho ou perda selectiva de células nos ensaios. Algumas faltas de concordância resultam directamente das limitações dos diferentes métodos, anteriormente discutidas.

### **3.4.1 Resultados positivos para FISH e negativos para RQ-PCR**

No estudo realizado foi encontrado no paciente 22 um resultado positivo para FISH e negativo para RQ-PCR sugerindo a existência pseudogenes. Estes dados coincidem com os obtidos noutros estudos e apontam para a necessidade de monitorização de pacientes com LMC para avaliar a DRM a nível do DNA (FISH) e a nível do RNA (RQ-PCR) para avaliar o risco de recaída (Chomel et al., 2000; Kitzis et al., 2001; Bao et al., 2007a).

Resultados concordantes entre as técnicas de FISH e de RQ-PCR verificam-se quase sempre nos casos em que existem muitas células com o cromossoma Ph positivo (Kim et al., 2002). Os pacientes em remissão após transplante de medula óssea apresentam uma pequena percentagem de células que expressam RNAm com a translocação BCR-ABL, pelo que pode ter maior vantagem a técnica de FISH (Zhang et al., 1996). No entanto, o RQ-PCR nos vários ciclos faz a amplificação do produto podendo ser detectadas pequenas quantidades de RNAm com a translocação BCR-ABL. Esta hipótese é reforçada pelos resultados obtidos por Kim et al (2002) com seis amostras positivas para FISH e negativas para RQ-PCR. (Kim et al., 2002).

Uma outra explicação para a ocorrência de resultados positivos por FISH e negativos por RQ-PCR pode ser a vida longa dos monócitos circulantes que podem ser detectados por FISH (Bhatia et al., 2003).

O facto de ter obtido este resultado no paciente 22 também se pode dever ao facto da técnica RQ-PCR utilizada neste estudo não contemplar nenhum *primer* nem sonda para a LMC com o ponto de quebra  $\mu$ -bcr. Além disso, também podemos estar perante um caso

de um resultado falso negativo que poderia ter sido causada pela qualidade do RNA, que se degrada mais rapidamente do que o DNA, ou pela presença de rearranjos raros. Em todo o caso, um resultado negativo com o RQ-PCR deve ser interpretado com precaução.

### **3.4.2 Resultados negativos para FISH e positivos para RQ-PCR**

No estudo realizado no pacientes 4 e no paciente 34 verificou-se um resultado negativo para FISH e positivo para RQ-PCR, uma situação idêntica a várias documentadas na literatura (Kim et al., 2002; Kantarjian et al., 2003; Raanani et al., 2004). Este limite nos resultados de FISH pode comprometer o acompanhamento individual apenas por esta técnica (Tchirkov et al., 1998; Colleoni et al., 2000; Kitzis et al., 2001; Kim et al., 2002; Bao et al., 2007). Os paciente 4 e 34 podem corresponder a situações de DRM que apenas é detectada por RQ-PCR devido à elevada amplificação associada a esta técnica. De um estudo envolvendo 266 amostras de pacientes após o transplante de medula óssea para acompanhamento da DRM concluiu-se que o RQ-PCR é mais sensível do que o FISH mas que os resultados devem ser cuidadosamente analisados (Kim et al., 2002). Este mesmo estudo demonstrou as limitações de FISH na detecção da DRM após o transplante de medula óssea, devido principalmente à sua falta de sensibilidade (Kim et al., 2002). Um outro estudo análogo de acompanhamento de pacientes com LCM após transplante, utilizou a sonda TaqMan e o controle ABL para o RQ-PCR, tal como no presente estudo. A resposta citogenética foi avaliada pelo FISH e os resultados foram idênticos aos do estudo anterior, concluindo-se que a técnica de RQ-PCR é sensível, precisa e fiável, e adequada à monitorização de pacientes com LMC após o transplante de medula óssea (Qin et al., 2006). Estas conclusões têm sido confirmadas em diversos estudos (Mensink et al., 1998; Raanani et al., 2004).

Embora não seja possível confirmar esta hipótese, é possível que os pacientes 4 e 34 possam ter já sido sujeitos a transplante de medula óssea, o que explicaria os resultados divergentes entre o estudo molecular e citogenético.

As evidências de situações em que a análise por FISH produzia resultados negativos contraditórios com o estudo molecular, suscitou recentemente a introdução no mercado de sondas mais sensíveis para a técnica de FISH, permitindo antever que esta técnica venha

igualmente a ser útil na avaliação da DRM (Aster et al., 2002; Fugazza et al., 2004; Vendrame-Goloni et al., 2006).

### **3.4.3 Cromossoma Ph negativo**

Em pacientes com LMC mas com cromossoma Ph negativo o diagnóstico torna-se particularmente complicado, e é também mais difícil o acompanhamento durante o tratamento. FISH e RQ-PCR são técnicas comumente utilizadas nos laboratórios de hematologia, mas poucos estudos têm comparado realmente a sua sensibilidade na detecção da DRM bem como a sua utilidade no diagnóstico de pacientes com cromossoma Ph negativo (Bao et al., 2007a). Pacientes com cromossoma Ph negativo podem desenvolver trissomia 8 sugerindo que a identificação da trissomia 8 pode ajudar na identificação de LMC cromossoma Ph negativo (Feldman et al., 2003). As sondas utilizadas no FISH são já desenhadas para contemplarem algumas anomalias citogenéticas adicionais o que pode ajudar na detecção do cromossoma Ph negativo. A técnica de RQ-PCR não permite, para já, detectar estas anomalias (Kaeda et al., 2002).

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados do estudo realizado apoiam o interesse do diagnóstico e da monitorização da LMC por técnicas de FISH e de RQ-PCR. Uma vez que estas técnicas apresentam vantagens e desvantagens, seria de grande importância um estudo com maior número de amostras e maior diversidade de situações clínicas, envolvendo o uso combinado de FISH e RQ-PCR, a fim de proporcionar uma melhor avaliação, e permitir a definição de orientações mais eficazes ao tratamento dos pacientes com LMC.

O aumento dos níveis da DRM pode constituir um pronúncio do desenvolvimento de resistência aos medicamentos, o maior risco de recaída ou a resposta insuficiente após o transplante de medula óssea. A meta da detecção precoce da DRM é permitir a intervenção atempada da terapêutica e detectar a resistência à terapia. O reconhecimento precoce da progressão da doença por RQ-PCR e FISH fornece uma mais-valia para a intervenção terapêutica.

Apesar de pelos resultados deste estudo se confirmar uma boa correlação entre os resultados das análises por FISH e por RQ-PCR, a ocorrência de resultados discordantes justifica que estes métodos sejam alvo de mais que permita a sua aplicação em situações menos típicas como seja o diagnóstico da LMC em doentes mieloproliferativos com cromossoma Ph negativo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler R, Viehmann S, Kuhlisch E, Martiniak Y, Röttgers S, Harbott J, Suttorp M (2008) Correlation of BCR/ABL transcript variants with patients' characteristics in childhood chronic myeloid leukaemia. *Eur J Haematol*, 82(2):112-118.

Andrikovics H, Nahajevszky S, Szilvási A, Bors A, Adám E, Kozma A, Kajtár B, Barta A, Poros A, Tordai A (2007) First and second line imatinib treatment in chronic myelogenous leukemia patients expressing rare e1a2 or e19a2 BCR-ABL transcripts. *Hematol Oncol*, 25(3):143-147.

Aster JC, Longtine JA (2002) Detection of BCL2 Rearrangements in Follicular Lymphoma. *Am J Pathol*, 160 (3):759-763.

Baccarani M, Pane F, Saglio G (2008) Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 93 (2):161-169.

Bao F, Munker R, Lowery C, Martin S, Shi R, Veillon DM, Cotelingam JD, Nordberg ML (2007a) Comparison of FISH and quantitative RT-PCR for the diagnosis and follow-up of BCR-ABL-positive leukemias. *Mol Diagn Ther*, 11(4):239-245.

Bao F, Polk P, Nordberg ML, Veillon DM, Sun A, Deininger M, Murray D, Andersson BS, Munker R (2007b) Comparative gene expression analysis of a chronic myelogenous leukemia cell line resistant to cyclophosphamide using oligonucleotide arrays and response to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Res*, 31(11):1511-1520.

Barnes DJ, Melo JV (2002) Molecular basis of chronic myeloid leukaemia *Acta Haematol* 108:180-202



Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P, Gabert J (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*, 17(12):2474-2486.

Bhatia R, Holtz M, Niu N, Gray R, Snyder DS, Sawyers CL, Arber DA, Slovak ML, Forman SJ (2003) Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood*, 101(12):4701-4707.

Breccia M, Stefanizzi C, Cannella L, Latagliata R, Frustaci AM, Carmosino I, Santopietro M, Alimena G (2008) Differences in hematological and non-hematological toxicity during treatment with imatinib in patients with early and late chronic phase chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 49(12):2328-2332.

Brizard F, Chomel JC, Veinstein A, Rivet J, Giraud C, Kitzis A, Guilhot F, Brizard A (1998) Does BCR-ABL genomic rearrangement persist in CML patients in complete remission after interferon alpha therapy? *Leukemia*, 12(7):1076-80.

Campos M, Montesano FT, Rodrigues MM, Chauffaille ML (2007) Clinical implications of der (9q) deletions though dual-fusion fluorescence in situ hybridization in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 178 (1):49-56.

Cianciulli M, Marzano R, Merola R, Orlandi G, Petti M C, Guadagni F, Pisani F (2004) Complex variant philadelphia translocation involving the short arm of chromosome 9 in case of chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 127-128.

Chauffaille M (2008) Análise citogenética e FISH no monitoramento da LMC em tratamento com inibidores da tirosina quinase. Rev. Bras. Hematol. Hemoter, vol.30, 1516-8484.

Chomel JC, Brizard F, Veinstein A, Rivet J, Sadoun A, Kitzis A, Guilhot F, Brizard A (2000) Persistence of BCR-ABL genomic rearrangement in chronic myeloid leukemia patients in complete and sustained cytogenetic remission after interferon-alpha therapy or allogeneic bone marrow transplantation. Blood, 95(2):404-408.

Clark RE, Wang L, Pearson K, Pillitteri LE, Ferguson JE (2001) Serial monitoring of BCR-ABL by peripheral blood real-time polymerase chain reaction predicts the marrow cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol, 118(3):771-7.

Colleoni GW, Jhanwar SC, Ladanyi M, Chen B. Diagn Mol Pathol (2000) Comparison of a multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction for BCR-ABL to fluorescence in situ hybridization, Southern blotting, and conventional cytogenetics in the monitoring of patients with Ph1-positive leukemias. Diagn Mol Pathol, 9(4):203-209.

Cony-Makhoul P, Bergeron A, Corm S, Dubruille V, Rea D, Rigal-Huguet F, Nicolini FE (2008) Guidelines for the management of dasatinib (Sprycel)-induced side effects in chronic myelogenous leukemia and Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemias. Bull Cancer, 95(9):805-811.

Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, Jones D, Luthra R, Shan J, Giles F, Faderl S, Verstovsek S, Garcia-Manero G, Rios MB, Kantarjian H (2005) Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib

mesylate. Clin Cancer Res, 11(9):3425-3432.

Cox MC, Maffei L, Buffolino S, Del Poeta G, Venditti A, Cantonetti M, Aronica G, Aquilina P, Masi M, Amadori S. A (1998) Comparative analysis of FISH, RT-PCR, and cytogenetics for the diagnosis of bcr-abl-positive leukemias. Am J Clin Pathol, 109(1):24-31.

Cross NC (1997) Assessing residual leukaemia. LRF Centre for Adult Leukaemia, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, London, UK Baillieres Clin Haematol, 10(2):389-403.

Deininger MW, Goldman JM, Melo JV (2000) The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood, 96(10):3343-3356.

Deininger MW (2008) Chronic myeloid leukemia: an historical perspective. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. Disponível em: <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/cgi/content/full/2008/1/418> acedido em 2009

DeVita Jr, Vincent T Jr; Lawrence, Theodore S; Rosenberg, Steven A; DePinho, Ronald A; Weinberg, Robert A, (2008) Cancer Principles & Practice of Oncology - 8/Ed Lippincott Williams.

Dewald GW, Wyatt WA, Juneau AL, Carlson RO, Zinsmeister AR, Jalal SM, Spurbeck JL, Silver RT (1998) Highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect double BCR/ABL fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. Blood, 91(9):3357-3365.

Ding K, Su Y, Pang L, Lu Q, Wang Z, Zhang S, Zheng S, Mao J, Zhu Y (2008) Inhibition of apoptosis by down-regulation of hBex1, a novel mechanism, contributes to the chemoresistance of Bcr/Abl+ leukemic cells. *Carcinogenesis*, 30(1):35-42.

Douet-Guilbert N, Morel F, Le Charpentier T, Le Bris MJ, Herry A, Morice P, Bourquard P, Abgrall JF, Berthou C, De Braekeleer M (2004) Interphase FISH for follow-up of Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia treatment. *Anticancer Res*, 24(4):2535-2539.

Duba HC, Peter S, Hilbe W, Fluckinger T, Fridrik M, Erdel M, Thaler J, Utermann G (1999) Monitoring of remission status by fluorescence in situ hybridisation in chronic myeloid leukaemia patients treated with interferon-alpha. *Int J Oncol*, 14(1):145-150.

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM (1999) The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 341(3):164-172.

Falcao, Zago (2001) *Hematologia: Fundamentos e Pratica*. Atheneu, Rio de Janeiro, 1040 pags.

Feldman E, Najfeld V, Schuster M, Roboz G, Chadburn A, Silver RT (2003) The emergence of Ph-, trisomy -8+ cells in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Exp Hematol*, 31(8):702-707.

Fugazza G, Miglino M, Bruzzone R, Quintino S, Gatti AM, Grasso R, Gobbi M, Frassoni F, Sessarego M (2004) Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization monitoring in Ph+ Chronic Myeloid Leukemia patients treated with imatinib mesylate.

J Exp Clin Cancer Res, 23(2):295-299.

Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cavé H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, González M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe against cancer program. *Leukemia*, 17(12):2318-2357.

Gisele WB, Colleoni M D, Suresh C, Jhanwar D, Marc Ladanyi MD (2000) Comparison of a multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction for BCR-ABL to fluorescence in situ hybridization, southern blotting, and conventional cytogenetics in the monitoring of patients with ph 1 positive leukemias. *Diagn Mol Pathol* 9(4): 203-209.

Goldman JM, Melo JV (2003) Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med*, 349:1451-1464.

Goldman JM (2007) How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Blood*, 110(8):2828-2837.

Gole LA, Bongso A (1997) Fluorescence in-situ Hybridization – Some of its Applications in Clinical Cytogenetics. *Singapore Medical Journal*, 38(11):497-503.

Gonçalves A (2005) Polimorfismo de citocinas em transplante de células estaminais hematopoiéticas. Tese de mestrado em Biologia Celular. Faculdade de Ciências e

Tecnologia Universidade de Coimbra. Coimbra.

Haigh S, Cuthbert G (2004) Fluorescence in situ hybridization characterization of different cryptic BCR-ABL rearrangements in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 155(2):132-137.

Hamerschlak N (2008) Leukemia: genetics and prognostic factors. *J Pediatr*, 84(4):52-57.

Hantschel O, Superti-Furga G (2004) Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5 (1):33-44.

Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M (2007) Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, 370(9584):342-350.

Hochhaus A, Lin E, Reiter A, Skladny H, Mason PJ van Rhee F, Shepherd PC, Allan NC, Hehlmann R, Goldmam JM, Cross NCP (1996) Quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients on interferon-alpha therapy by competitive polymerase chain reaction. *Blood*. 87(4):1549-1555.

Hochhaus A (2002) Minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia patients. *Best Pract Res Clin Haematol*, 15(1):159-178.

Hochhaus A (2008) Prognostic factors in chronic myeloid leukemia (CML). *Onkologie*, 31(11):576-8.

Hofbrand AF, Catovsky D, Tuddenham EGD (2005) *Postgraduate Haematology*. Fifth

edition. Blackwell Publishing, 492-495.

Hoffrand, Moss, Pettit (2006) Essential Hematology. Blackwell. Massachusells. USA, 392 pags.

Hughes T (2006) ABL kinase inhibitor therapy for LMC: baseline assessments and response monitoring. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 211-218.

Huntly BJ, Reid AG, Bench AJ, Campbell LJ, Telford N, Shepherd P, Szer J, Prince HM, Turner P, Grace C, Nacheva EP, Green AR (2001) Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. Blood, 15;98(6):1732-1738.

Inokuchi K (2006) Chronic myelogenous leukemia: from molecular biology to clinical aspects and novel targeted therapies. J Nippon Med Sch, 73(4):178-192.

Jain KK (2004) Current Status of Fluorescence In-Situ Hybridisation. Med Device Technol. 2004 May;15(4):14-7.

Jamieson CH (2008) Chronic myeloid leukemia stem cells. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 436-442.

Jesus C (2007) Avaliação de parâmetros laboratoriais e clínicos de pacientes portadores de leucemia mieloide crônica submetidos ao tratamento com mesilato de imatinib e a sua relação com alterações observados no estroma da medula óssea. Tese de pós graduação em farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

Jha CB, Kucheria K, Choudhary VP (2006) Diagnostic role of conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization (FISH) in chronic myeloid leukemia patients. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)*, 4(2):171-175.

Jiang F, Katz RL (2002) Use of interphase fluorescence in situ hybridization as a powerful diagnostic tool of cytology. *Diagnostic Molecular Pathology*, 11(1):47-57.

Jiang J, Gill BS (2006) Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49(9):1057-1068.

Jones D, Kamel-Reid S, Bahler D, Dong H, Elenitoba-Johnson K, Press R, Quigley N, Rothberg P, Sabath D, Viswanatha D, Weck K, Zehnder J (2008) Laboratory practice guidelines for detecting and reporting BCR-ABL resistance mutations in chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia. A Report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 11(1):4-11.

Johansson, B. Fioretos, T. Mitelman, F (2002) Cytogenetics and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematologica*, 107(2):76-94.

Joske DJ (2008) Chronic myeloid leukaemia: the evolution of gene-targeted therapy. *Med J Aust*, 189(5):277-282.

Kaeda J, Chase A, Goldman JM (2002) Cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematol*, 107(2):64-75.

Kaeda J, Chase A, Goldman JM (2002) Cytogenetic and molecular monitoring of



residual disease in chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematol*,107(2):64-75.

Kantarjian HM, Talpaz M, Cortes J, O'Brien S, Faderl S, Thomas D, Giles F, Rios MB, Shan J, Arlinghaus R (2003) Quantitative polymerase chain reaction monitoring of BCR-ABL during therapy with imatinib mesylate (STI571; gleevec) in chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*, 9(1):160-166.

Kantarjian HM, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Cortes J (2006) New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. *Ann Intern Med*, 145(12):913-923.

Kim YJ, Kim DW, Lee S, Kim HJ, Kim YL, Hwang JY, Oh IH, Park YH, Lee YK, Min CK, Kim TG, Han TH, Min WS, Kim CC (2002) Comprehensive comparison of FISH, RT-PCR, and RQ-PCR for monitoring the BCR-ABL gene after hematopoietic stem cell transplantation in CML. *Eur J Haematol*, 68(5):272-280.

Kim DH, Popradi G, Sriharsha L, Kamel-Reid S, Chang H, Messner HA, Lipton JH (2008) No significance of derivative chromosome 9 deletion on the clearance kinetics of BCR/ABL fusion transcripts, cytogenetic or molecular response, loss of response, or treatment failure to imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *Cancer*, 113(4):772-81.

Kitzis A, Brizard F, Dascalescu C, Chomel JC, Guilhot F, Brizard A (2001) Persistence of transcriptionally silent BCR-ABL rearrangements in chronic myeloid leukemia patients in sustained complete cytogenetic remission. *Leuk Lymphoma*, 42(5):933-944.

Landstrom AP, Ketterling RP, Knudson RA, Tefferi A (2006a) Utility of peripheral blood dual color, double fusion fluorescent in situ hybridization for BCR/ABL fusion to assess cytogenetic remission status in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 47(10):2055-2061.

Landstrom AP, Tefferi A (2006b) Fluorescent in situ hybridization in the diagnosis, prognosis, and treatment monitoring of chronic myeloid leukemia. Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN 55905, USA. *Leuk Lymphoma*, 47(3):397-402.

Levsky JM, Singer RH (2003) Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci*, 116(14):2833-2838.

Lichtman M, Beutler E, Kipps T, Seligsohn U, Kaushansky K, Pschal J (2007) *Williams Hematology*. McGraw-Hill, 1750 pags.

Liu Q, Zhu Y, Qiu HX, Qiu HR, Wang R, Xu W, Li JY (2008) Analysis of chromosome-8 aberrations in myeloid malignancies with complex chromosome abnormalities. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 16(5):993-996.

Lundán T, Juvonen V, Mueller MC, Mustjoki S, Lakkala T, Kairisto V, Hochhaus A, Knuutila S, Porkka K (2008) Comparison of bone marrow high mitotic index metaphase fluorescence in situ hybridization to peripheral blood and bone marrow real time quantitative polymerase chain reaction on the International Scale for detecting residual disease in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 93(2):178-185.

Malvestiti F, Colombo D, Perego D, Rodeschini O, Finelli P, Larizza L, Giardino D (2009) Fluorescence in situ hybridization dissection of a chronic myeloid leukemia

case bearing the apparently balanced translocations (9;22)(q34;q11.2) and (11;11)(p15;q13). *Cancer Genet Cytogenet*, 188(1):42-47.

Mark HF, Sokolic RA, Mark Y (2006) Conventional cytogenetics and FISH in the detection of BCR/ABL fusion in chronic myeloid leukemia (CML). *Exp Mol Pathol*, 81(1):1-7.

Marktel S, Marin D, Foot N, Szydlo R, Bua M, Karadimitris A, De Melo VA, Kotzampaltiris P, Dazzi F, Rahemtulla A, Olavarria E, Apperley JF, Goldman JM (2003) Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression. *Haematologica*, 88(3):260-267.

Mensink E, van de Locht A, Schattenberg A, Linders E, Schaap N, Geurts van Kessel A, De Witte T (1998) Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Haematol*, 102(3):768-74.

Merx K, Müller MC, Kreil S, Lahaye T, Paschka P, Schoch C, Weisser A, Kuhn C, Berger U, Gschaidmeier H, Hehlmann R, Hochhaus A (2002) Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha. *Leukemia*, 16(9):1579-1583.

Mitelman F, Johansson B, Mertens F (2001) Recurrent chromosome aberrations in cancer. Disponível em: [http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Recurrent\\_Aberrations](http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Recurrent_Aberrations) acessado em 2008.

Müller MC, Merx K, Weisser A, Kreil S, Lahaye T, Hehlmann R, Hochhaus A (2002) Relationship of molecular monitoring of residual disease in leukemias by

bedside RNA stabilization. *Leukemia*, 16(12):2395-2399.

Nalwa HS, Singh S (2007) Nanotechnology and health safety--toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health. *J Nanosci Nanotechnol*, 7(9):3048-70.

Pienkowska-Grela B, Woroniecka R, Solarska I, Kos K, Pastwińska A, Konopka L, Majewski M (2007) Complete cytogenetic and molecular response after imatinib treatment for chronic myeloid leukemia in a patient with atypical karyotype and BCR-ABL b2a3 transcript. *Cancer Genet Cytogenet*, 174(2):111-115.

Polakova KM, Zmekova V, Rulcova J, Klamova H, Zemanova Z, Moravcova J (2008) BCR-ABL mutations in chronic myeloid leukemia - not only detection. *Leuk Lymphoma*, 49(8):1620-1622.

Polampalli S, Choughule A, Negi N, Shinde S, Baisane C, Amre P, Subramanian PG, Gujral S, Prabhash K, Parikh P (2008) Analysis and comparison of clinicohematological parameters and molecular and cytogenetic response of two Bcr/Abl fusion transcripts. *Genet Mol Res*, 7(4):1138-1149.

Press RD, Brazier RM, Magenis RE (2001) BCR-ABL RNA levels (by quantitative RT-PCR) correlate with cytogenetic detection of the t(9;22) in STI571-treated leukemic patients. *Blood*, 99:614a.

Qin YZ, Li JL, Zhu HH, Ruan GR, Li LD, Zhang Y, Xu LP, Liu DH, Liu YR, Huang XJ, Chen SS, Lu DP (2006) Monitoring bcr-abl mRNA levels by real-time quantitative RT-PCR in chronic myeloid leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 27(8):511-514.

Raanani P, Ben-Bassat I, Gan S (2002) Assessment of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia patients: comparison between the FISH, multiplex and RT-PCR methods. *Eur J Haematol*, 73 (4):243 – 250.

Raanani P, Ben-Bassat I, Gan S, Trakhtenbrot L, Mark Z, Ashur-Fabian O, Itskovich S, Brok-Simoni F, Rechavi G, Amariglio N, Nagler A (2004) Assessment of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia patients-comparison between the FISH, multiplex and RT-PCR methods. *Eur J Haematol*, 73(4):243-250.

Raanani P, Trakhtenbrot L, Rechavi G, Rosenthal E, Avigdor A, Brok-Simoni F, Leiba M, Amariglio N, Nagler A, Ben-Bassat I (2005) Philadelphia-chromosome-positive T-lymphoblastic leukemia: acute leukemia or chronic myelogenous leukemia blastic crisis. *Acta Haematol*, 113(3):181-189.

Reinhold U, Hennig E, Leiblein S, Niederwieser D, Deininger MW (2003) FISH for BCR-ABL on interphases of peripheral blood neutrophils but not of unselected white cells correlates with bone marrow cytogenetics in LMC patients treated with imatinib. *Leukemia*, 17(10):1925-9.

Richebourg S, Eclache V, Perot C, Portnoi MF, Van den Akker J, Terré C, Maarek O, Soenen V, Viguié F, Lai JL, Andrieux J, Corm S, Roche-Lestienne C; Fi-LMC Group (2008) Mechanisms of genesis of variant translocation in chronic myeloid leukemia are not correlated with ABL1 or BCR deletion status or response to imatinib therapy. *Cancer Genet Cytogenet*, 182(2):95-102.

Roche-Lestienne C, Deluche L, Corm S, Tigaud I, Joha S, Philippe N, Geffroy S, Lai JL, Nicolini FE, Preudhomme C; Fi-LMC group (2008) RUNX1 DNA-binding

mutations and RUNX1-PRDM16 cryptic fusions in BCR-ABL+ leukemias are frequently associated with secondary trisomy 21 and may contribute to clonal evolution and imatinib resistance. *Blood*, 111(7):3735-41.

Rohrbacher M, Berger U, Hochhaus A, Metzgeroth G, Adam K, Lahaye T, Saussele S, Müller MC, Hasford J, Heimpel H, Hehlmann R (2008) Clinical trials underestimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/BCR-ABL-positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany. *Leukemia*, 23(3):602-604.

Rulcová J, Zmeková V, Zemanová Z, Klamová H, Moravcová J (2007) The effect of total-ABL, GUS and B2M control genes on BCR-ABL monitoring by real-time RT-PCR. *Leuk Res*, 31(4):483-491.

Schoch C, Schnittger S, Bursch S, Gerstner D, Hochhaus A, Berger U, Hehlmann R, Hiddemann W, Haferlach T (2002) Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia*, 16(1):53-59.

Schoch C, Schnittger S, Bursch S, Gerstner D, Hochhaus A, Berger U, Hehlmann R, Hiddemann W, Haferlach T (2002) Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia*, 16(1):53-59.

Sekeres, Kalaycio, Bolwell (2007) *Clinical Malinical Malignant Hematology*. Mcgraw Hill. 1191 pags.

So CC, Wan TS, Yip SF, Chan LC (2008) A dual colour dual fusion fluorescence in situ hybridisation study on the genesis of complex variant translocations in chronic myelogenous leukaemia. *Oncol Rep*, 19(5):1181-1184.

Swiger RR, Tucker JD (1996) Fluorescence in situ hybridization: A Brief review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27(4):245-254.

Tchirkov A, Giollant M, Tavernier F, Briançon G, Tournilhac O, Kwiatkowski F, Philippe P, Choufi B, Deméocq F, Travade P, Malet P (1998) Interphase cytogenetics and competitive RT-PCR for residual disease monitoring in patients with chronic myeloid leukaemia during interferon-alpha therapy. *Br J Haematol*, 101(3):552-557.

Thijssen SF, Schuurhuis GJ, van Oostveen JW, Theijssmeijer AP, Langenhuijsen MM, Ossenkoppele GJ (1997) Molecular analysis of hematopoietic colonies derived from chronic myeloid leukemia patients: interphase fluorescence in situ hybridization compared with RT-PCR. *Leukemia*, 11(2):301-305.

Valent P, Lion T, Wolf D, Sillaber C, Agis H, Petzer A, Lang A, Kalhs P, Geissler D, Greil R, Linkesch W, Burgstaller S, Thaler J, Gastl G (2008) Diagnostic algorithms, monitoring, prognostication, and therapy in chronic myeloid leukemia (CML): a proposal of the Austrian CML platform. *Wien Klin Wochenschr*, 120(21-22):697-709.

Vendrame-Goloni Cristina B, Andréa B.Carvalho-Salles, Octávio Ricci Júnior, Carlos E.Miguel, Agnes C.Fett-Conte (2006) Analysis of the BCR/ABL rearrangement by GTG banding and FISH: A comparison of frequencies at diagnosis of CML. *Ciênc Saúde*, 13(1):07-11.

Vendrame-Goloni CB, Carvalho-Salles AB, Ruiz MA, Ricci Júnior O, Varella-Garcia M, Fett-Conte AC (2008) Clinical outcome in chronic myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the experience of the Bone Marrow Transplantation Unit of Funfarme/Brazil using FISH. *Genet Mol Res*, 7(2):417-423.

Vianna J, Almeida E (2006). Chronic myeloid leukemia: treatments employed in the diferents stages of the illness. *Saúde & Ambiente em Revista*, 1(2):60-69.

Virgili A, Brazma D, Reid AG, Howard-Reeves J, Valgañón M, Chanalaris A, De Melo VA, Marin D, Apperley JF, Grace C, Nacheva EP (2008) FISH mapping of Philadelphia negative BCR/ABL1 positive CML. *Mol Cytogenet*, 1(1):14.

Volpi EV, Bridger JM (2008) FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques*, 45(4):385-409.

Wei Y (2008) Molecular Monitoring of Chronic Myeloid Leukemia Treated with Imatinib Mesylate. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, 30 (1) 1516-8484.

Wu W, Li JY, Shen YF, Cao XS, Qiu HR, Xu W (2007) The prognostic significance of derivative chromosome 9 deletions in chronic myeloid leukemia. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 46(5):386-388.

Xinh PT, Vu HA, Nghia H, Binh NT, Van Be T, Van Binh T, Tokunaga K, Sato Y (2006) Coexistence of Philadelphia chromosome positive cells with and without der(9) deletion in a patient with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 164(2):122-127.



Yamamoto JF, Goodman MT (2008) Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Causes Control*, 19(4):379-390.

Zhang JG, Lin F, Chase A, Goldman JM, Cross NC (1996) Comparison of genomic DNA and cDNA for detection of residual disease after treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 87(6):2588-2593.